

博士論文（要約）

抗酸化剤ルチンによる放射線防護基礎過程の研究
Study on fundamental process of radiation protection
by antioxidant rutin

于 暁

目次

第1章	序論.....	- 1 -
1.1.	放射線とガン治療での利用.....	- 1 -
1.2.	放射線の生体影響の初期過程.....	- 6 -
1.3.	放射線に対する防護.....	- 12 -
1.4.	フラボノイドとルチン.....	- 16 -
1.5.	ルチンの放射線防護の既往研究.....	- 18 -
1.6.	本研究の目的と論文構成.....	- 20 -
第2章	パルスラジオリシス法による放射線防護初期過程の直接観測.....	- 26 -
2.1.	パルスラジオリシス法と本章の目的.....	- 26 -
2.2.	実験方法.....	- 28 -
2.3.	結果と議論.....	- 30 -
2.4.	第二章のまとめ.....	- 36 -
第3章	放射線由来の DNA 変異を高感度に検出する手法の確立.....	- 46 -
3.1.	安定な DNA 損傷の検出法と本章の目的.....	- 46 -
3.2.	第三章のまとめ.....	- 48 -
第4章	安定な DNA 損傷の生成頻度からルチンの防護効果への評価.....	- 49 -
4.1.	抗酸化剤添加の防護効果と本章の目的.....	- 49 -
4.2.	第四章のまとめ.....	- 50 -
第5章	結論と今後の展望.....	- 51 -
5.1.	結論.....	- 51 -
5.2.	今後の展望.....	- 52 -
参考文献	- 54 -
謝辞	- 64 -
付録	i
	プラスミド DNA の抽出.....	i

DNA サンプル調製.....	v
照射.....	viii
酵素処理.....	x
電気泳動.....	xii

第1章 序論

1.1. 放射線とガン治療での利用

日本のがん（悪性腫瘍）患者の5年の生存率は男女全体で62%(Matsuda et al. 2011)と最近では着実に上がり、もはや「がんは不治の病」というイメージは払拭されてきている。また近年の科学技術の発達により先進国が未曾有のペースで高齢化が進んでいる。日々酸化ストレスを受けている生体は、細胞の突然変異の可能性が増加し、がん罹患する確率も高くなる。日本での生涯がん罹患率は男性が62%、女性が47%であり(Hori et al. 2015)、長寿命化に伴い今後がん罹患率も増えていくことが予想される。がん治療での目標は延命という生存期間の延長から、術後生活の質（Quality of Life、QOL）を向上させることにシフトし、新たながん治療法もそれに対応していく必要がある。

放射線がん治療は放射線の生体への影響と切り離して考えることはできない。放射線はDNAに損傷を与えるため、この特徴を利用してがん細胞を制圧すれば、治療に使える。手術（外科的療法）と比べて、放射線治療の場合は侵襲性が低く、術後の回復が早い。また化学療法と比べても標的にフォーカスしやすい特徴がある。更に、病変部位や患者の体力などの制限が少なく、優れたがん治療法として広く認知されている。

1.1.1. 放射線の定義と種類

原子力基本法では「放射線は電磁波又は粒子線のうち、直接又は間接に空気を電離する能力をもつもの」（第3条第5号）と定められ、一般的に電離放射線のことを放射線として略称する(飯田博美 2005)。紫外線より長い波長の可視・赤外光線や電波は電離作用を持たないため非電離放射線として扱う。放射線は更に電磁波と粒子線と粒子の種類によって分類できる。紫外線はDNAを構成する塩基分子を励起することによりDNA損傷を形成できるが、法令では放射線として取り扱われない。

X線と γ 線はともに電磁波（光子線）であるが、軌道電子の遷移により生じたものをX線、原子核が励起状態から原子核内のエネルギー準に遷移する際生じるものを γ 線と分類する。どちらも電磁波であるため物理的な性質は同様であり、物質との相互作用としては主に光電効果、コンプトン効果、電子対生成によりエネルギーを電子に与える。

荷電粒子（粒子線）は電荷を持った粒子のことを指し、特に陽子より重い粒子は重粒子と呼ぶことが多い。荷電粒子が物質中を通過する際、物質中の電子

と相互作用して電離及び励起を引き起こす。特に重粒子は原子量が大きいため、物質中で散乱されにくく、直進しやすい。

物質を透過する際に失うエネルギーは、**Bethe-Bloch** の式より核電荷の 2 乗に比例し、速度の 2 乗に反比例することが分かる。そのため、荷電粒子は低速になると、阻止能が急増し急停止する。単位長さの飛跡で落としたエネルギーは線エネルギー付与 (**LET, eV/nm**) と呼ばれる。1903 年にイギリスの物理学者 **William Bragg** (ブラッグ) が粒子線の比電離の変化曲線を解明した。後にその変化曲線はブラッグ曲線と名付けられ、また電離密度の極大領域はブラッグピーク (**Bragg peak**) と呼ばれるようになった。粒子線はブラッグピークがあるため、X 線より特定部位に多くの線量を集中させられる。粒子線のエネルギー付与イベントは密のため、特有な円筒状のトラック構造 (**track structure**) が形成される。粒子線は酸素増感比 (**Oxygen Enhancement Ratio, OER**) が低く、酸素の有無による治療効果の差が生じにくく、低酸素状態であるがん細胞にも効果的に治療が行える。このほかに、電子線や中性子線などもがん治療に用いられることがある。電子線は真空管内で高周波を使い、電子の塊を収集した電子ビームである。電子線の通過力は低く、一般的な高エネルギー放射線治療以外に使う場面が限られている。一方、中性子は荷電粒子であり、中性子と反応断面積の大きい元素との核反応より体内で粒子線を放出する中性子捕捉療法がある。例えば、ホウ素に中性子を照射すると、ヘリウム線が放出されることが知られている (ホウ素中性子捕捉療法)。

1.1.2. 放射線の発見と治療での利用

がんの放射線治療は、外科的治療 (手術) 及び化学的治療 (薬剤投与) とともにがん治療の三本柱である。最初に、放射線その発見と治療での応用の歴史を簡単に紹介したい (Burns 1987, Lloyd 1998, Hall et al. 2006)。ドイツ物理学者 **Wilhelm Röntgen** 氏は 1895 年に放射線を発見し、**Antoine Becquerel** 氏はその翌年に放射能を発見した。放射線 (最初は X 線と γ 線) は強い透過性が特徴である。例えば X 線は密度に応じて透過率が異なる特徴があり、情報通信の遅い当時でも瞬く間に科学界全体へ浸透し、撮影による臓器や骨の可視化など、医療での応用可能性がすぐに検討された。また、医師らは試験的な観点で、不治の病に対する放射線利用を試みた。世界初の放射線治療例として、1896 年にフランスの医者 **Victor Despeignes** 氏が胃がんの放射線治療を行ったことがあげられる。結果的に患者は命を落としたが、一週間程度の照射によりがん患部の縮小が確認された。しかし、この時の治療は複数の療法を用いたため、放射線の寄与度合いは厳密には知りえなかった。同年 1896 年にはオーストリアの **Leopold Freund** 氏が X 線照射により痣に密生した毛の脱毛に成功したことも報告された。その数カ月後に、皮膚組織の悪性腫瘍 (がん) に対する X 線照射事例も学

術雑誌に投稿された。放射線が発見された翌年から、試験的に放射線によるがん治療が行われていた、放射線治療の期待が高かったことがうかがえる。1898年に Pierre Curie 氏と Marie Curie 氏の夫婦がラジウムを発見した。X 線と比べて、ラジウムから放出される放射線 (β 線と γ 線) は利用しやすいため、放射線治療が一気に普及し始めた。1920 年まで約 20 年間に物理学の発達により原子、原子核、電磁気粒子の正体が明らかにされ、X 線や γ 線の性質の解明もされた。まさに放射線発見の時代であった。

X 線の発生は電子ビームの加速に依存するため、荷電粒子の加速技術の向上、つまり加速器の開発に大きく影響を受ける。1913 年頃に X 線管内の管電圧が 130-200 kV、1920 年頃に 500 kV-2 MV までに上昇した。また、長い直線上の真空容器中に高周波の電圧を加えることで、円筒内の粒子が電圧を受けて加速し続ける線形加速器が 1929 年に Van de Graaff 氏より案出された。翌年に Ernest Lawrence 氏より円形加速器が考案され、電子ビームの速度が更に向上した。その後、1940 年頃に 2-30 MeV の電子線を用いた放射線治療が実用化できるようになった。高電圧や高周波により生成された電子線と X 線は高いエネルギーを持つため、生体表面の皮膚組織だけでなく、深部の腫瘍に対する治療も可能となってきていた。しかし、臨床応用は電子の加速エネルギーの増加に伴って使用しやすくなるとは限らなかった。エネルギーが高いため、生体組織を通過する際の横散乱があり、正常組織へのダメージもあることから一層の制御が求められた。

電子線以外の荷電粒子の加速も開発された。E. Lawrence 氏のアイデアを受け、1946 年に Robert Rathbun Wilson 氏が陽子 (プロトン) を加速する陽子線加速器を作り、現在の粒子線利用の原点となった。また、彼は粒子線に特有の体内での飛跡特徴 (William Henry Bragg 氏が 1903 年に発見したブラッグカーブ) を活用する放射線治療法を提唱した。その後、粒子加速器の開発が進み、高エネルギーまで加速することが可能になったため、臨床でも実用化され始めた。早くも 1954 年に人体での臨床試験が始まり、1961 年には神経放射線手術のために Raymond N. Kjellberg 氏をはじめとしたマサチューセッツ総合病院とハーバード・サイクロトロン研究所の共同チームにより初めて重粒子線の治療が行われた。重粒子は陽子より重い核を持ち、ブラッグピークの線量集中性が優れている。日本も 1979 年から放射線医学総合研究所 (現・国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究開発部門) での試験が始まり、1994 年に重粒子線がん治療装置 (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba, HIMAC) が稼働した (Torikoshi et al. 2007)。放射線治療に適応する腫瘍の種類が増加し、従来の難治がんも治療できる可能性が大きくなった。2020 年現在、日本に重粒子線・粒子線治療施設が計 23 カ所あり、平成 27 年度までに述べ 34,000 名の患者が治療を受けている。

1.1.3. 放射線の生体影響の認識

放射線発見からの30年間は、放射線利用の利点が注目を集めており、放射線由来の生体影響はほとんど解明されないままであった。その後、放射線による後遺症が認識され始め、放射線由来の損傷への理解が深まった(Burns 1987, Lloyd 1998, Hall et al. 2006)。1896年、米国のJohn Daniel教授はX線写真の撮影依頼時に、X線管球に向いている部分に脱髪跡が見つかった。彼はこの特徴を利用して、様々な皮膚疾患への治療を試みたが、脱髪そのものが放射線の副作用であることはあまり認識していなかった。同年2月にFriedrich Claussen氏がベルリンでX線の研究室を設立し、自ら右手への放射線照射をしたデモンストラーションを公衆に向けて百回以上に行っていた。彼は急性障害が生じうるほど被ばくし、重度の火傷を負った。次第に皮膚がんが発生し、延命治療のために右腕を切断したが、それでも1900年にがんの播種性転移で亡くなった。F. Claussen氏は放射線障害で最初の犠牲者と認識されている。

放射線の生体影響の認識不足は放射線障害の特徴に関連している。放射線は局部に集中してエネルギーを付与するため、受けたエネルギーで火傷しても急性死に至るケースは極めてまれである。放射線の急性障害を除き、被ばく線量が高くても当面はその影響が確認できないことが多い。放射線による生体影響は長い年月に表れないこともあるため、長期間の追跡調査をしない限り、生体への影響を明らかにすることは困難であった。特にTheodore Puck氏が1956年に開発した単一細胞からのコロニー形成法を確立するまでに定量的な評価手段がなかった。

しかし、一部の研究者や政府関係者は放射線の生体影響は早い段階から気づいていた。可能な限りに関連研究を実施し、法令の考案や作成を行った。1908年にJean Clunet氏がX線照射によりラットに皮膚癌を形成させ、X線の発がん作用を証明した。研究結果を受けて米国レントゲン線学会は1924年10月に放射線従事者に対する放射線被ばくの許容限度の勧告を策定した。その後1928年に国際放射線防護委員会(ICRP)が発足し、組織構造の変更があったものの、放射線による生体影響への調査を継続的に行ってきた。ICRPは放射線利用に対する勧告を多数に定め、現在では各国の放射線関係の法令がICRP勧告のもとに作成されている。

第二次世界大戦原での原爆の利用は人類に対して大きな災難を与えた。大戦後には放射能や放射線への研究調査が増え、危険性に対する理解が深められた。長年にわたる原爆被ばく者に関する調査より、急性期の放射線影響及び晩発性の影響を追跡することで解明されてきた。また、1960年代から確立された生物学的な実験手法も放射線に対する理解に有用となっている。コロニー形成法などの細胞毒性評価法に基づいて研究が進めており、細胞レベルから動物実

験まで、放射線由来の生体影響の正体を全面的に解明できるようになってきている。

1.2. 放射線の生体影響の初期過程

放射線の生体影響は放射線由来のエネルギーが生体に付与する時点から始まっている（図 1-1）。放射線由来のエネルギー総量は熱的に換算すると微量であるが、エネルギー付与が不均一のため、局所的に密な損傷を形成させることができる。

放射線の生体影響は、主に DNA (deoxyribonucleic acid) が標的になっていると考えられている。ヌクレチオド (nucleotide) は塩基 (nucleobase)、五炭糖 (deoxyribose)、リン酸から結合して生成され、DNA は数多くのヌクレチオドが繋がって二本の線が平行して螺旋状になった高分子生体物質である。地球上の多くの生物は DNA を利用して遺伝情報を伝達する。二重螺旋構造となった DNA の多くは塩基対間距離が約 0.34 nm である。DNA を構成する四種類の塩基は、アデニン (adenine) とグアニン (guanine) をプリン塩基と、チミン (thymine) とシトシン (cytosine) をピリミジン塩基と分類できる。DNA 以外の生体物質（例えばミトコンドリアなど）に対しても放射線作用はあるが、その影響は限定的である。

放射線は短時間で大量のエネルギーを DNA 局所に付与することで DNA 分子に損傷を与える。例えば、放射線によるイオン化で放出されるエネルギーは約 33 eV で、強い結合（炭素二重結合は 4.9 eV 程度）でも切断できる。

放射線作用はエネルギー付与の仕方により、直接作用と間接作用の二通りに分けられる。直接作用とは、放射線が DNA を直接電離及び励起し、DNA に損傷を引き起こすことである。一方、間接作用は水の放射線分解でできたフリーラジカルが DNA に損傷を与えることを指している。フリーラジカルとは、不対電子を持つ原子や分子のことである。

1.2.1. 放射線の物理的影響（直接作用）

直接作用は放射線作用の約半分を占め、DNA に直接エネルギーを堆積する効果（直接効果）のほかに、擬直接効果ともいうべき効果も考えられている。これは、溶媒和殻にある水分子がイオン化し、水分子のラジカルカチオン H_2O^+ からホールが移動し、あるいは個の水分子のイオン化の際に放出された電子により損傷が生じる過程である (Sevilla et al. 2008)。脱励起により熱となる分を除くと、液体の水へのエネルギー付与の 9 割がイオン化によるもので、DNA でも同程度と示唆されている。イオン化は電子損失（正孔またはラジカルカチオン）と電子の獲得（ラジカルアニオン）に分けられ、これらを追跡すれば、直接効果による損傷のメカニズムを調べられる。研究できる。高等生物の

DNA は染色体の形態に凝縮されるため、DNA 付近の水分が効果的に排除でき、直接効果の重要性も高い。

直接作用の割合は LET (Linear Energy Transfer、線エネルギー付与) に依存する。X 線や γ 線が低 LET 放射線に属し、中性子線、陽子線、重粒子線は高 LET 放射線に属する。deLara らはラジカル捕捉剤 DMSO (Dimethyl sulfoxide、ジメチルスルホキシド) を 0.6 mol dm^{-3} 利用し、 α 線と低 LET 放射線である ^{60}Co γ 線の V79-4 細胞に対する直接作用及び間接作用の割合を検討した(deLara et al. 1995)。DMSO が薬剤として直接作用への防護・修復効果を有することを無視すると、低 LET 放射線由来の直接作用は 40-50%程度で、高 LET (120 keV/ μm) は 60-70%と決定されている。

1.2.2. 水の放射線分解と間接作用

直接作用と同様に、間接作用は放射線作用の約半分を占める。間接作用は、放射線が間接的に DNA 分子に作用することであり、具体的には人体の主成分である水が放射線のエネルギーを受け取って分解してラジカルを形成し、水分分解ラジカルが DNA などの生体高分子に影響することを指す。ここでは水の放射線分解の概要を図 1-2 に示す。水分子は放射線のエネルギーを吸収することで、イオン化及び励起する。励起された水分子は主に H ラジカルと OH ラジカル ($\cdot\text{OH}$) に分裂する。電離された水分子は周囲の水分子にプロトン (H^+) を受け渡すことにより $\cdot\text{OH}$ となる。一方、電離で弾き出された電子は、水分子の分極により正電荷の部分が電子の周りに配向し水和電子となる。放射線のエネルギー吸収からピコ秒 (10^{-12} s) までの間に、主に 5 種類の化学種



が生成する。この時点での収量をイニシャル収量 (initial yield) と呼ぶ。エネルギー付与の起こる数 nm 半径の局所領域はスパー (spur) と呼ばれる。低 LET 放射線の場合、スパーが数百 nm 間隔で存在するのに対し、高 LET 放射線では隣り合うスパーが重なり合うようになる。また、水分分解生成物の反応性は高いため相互に反応する。これをスパー (内) 反応 (spur reaction) と呼ぶ。局所に高濃度で生成した水分分解生成物は拡散し、約 100 ns (10^{-7} s) までの間にスパー反応がほぼ終了する。その均一化された時の収量はプライマリ収量 (primary yield) と呼ばれる。

水の放射線分解ラジカルの生成率は LET に依存する。高 LET では生成した $\cdot\text{OH}$ が密であり、ラジカル同士の再結合もされやすい。したがって、低 LET と比較すると、高 LET ではラジカルのプライマリ収量が小さく、ラジカル同士の反応生成物量が大きくなる。つまり LET が高くなると、間接作用の割合が小さ

くなる傾向が見られる。表 1-1 に代表的な X 線とヘリウム線での生成物収量をまとめた。

間接作用は生体高分子 DNA 当たりのラジカルの数量や種類に依存するため、修飾要因として希釈効果、酸素効果、保護効果、温度効果と大別できる(飯田博美 2005)。希釈効果とは、溶質 (DNA) が溶媒中 (水) での濃度に依存して、放射線による影響を受ける割合のことを指している。同じ吸収線量なら、低濃度の DNA のほうが DNA あたりに反応するラジカルの量が多くなり、結果的に DNA は多くの損傷を受ける。酸素効果とは、水中の酸素分布や濃度によって、ラジカル同士の再結合や順次反応を促進させたり、DNA 損傷の安定化を早く進められたりする効果のことを言う。防護効果は、薬剤添加による放射線への影響のことで、水の放射線ラジカルと反応しやすい薬剤が溶媒中に添加すると、ラジカルが薬剤と反応してラジカル消費される。このため、DNA と反応できるラジカルが減ることで、DNA に対する放射線防護効果が見られる。温度効果は、ラジカルの反応速度や拡散速度は温度に依存するため、温度が低下すると、放射線作用が低減されることを意味している。更に、血流の変化なども生体影響を作用する。このように、溶質・溶媒にかかわるいくつかの要因から、放射線の間接作用は影響を受ける。

間接作用は主にラジカルの生成と消滅に伴う。水の放射線分解ラジカルは不対電子を持ち短時間で消滅するため、その挙動を追跡するには高速の測定法、例えばパルスラジオリシス法や電子スピン共鳴法で観測する必要がある。ラジカル同士及びラジカルと DNA の反応挙動を追跡することで、間接作用の発生とその防護のメカニズムを調べることができる。

● $\cdot\text{OH}$ による DNA 損傷

水の放射線分解ラジカルの主要生成物は OH ラジカル ($\cdot\text{OH}$) と水和電子 (e_{aq}) である。そのうち $\cdot\text{OH}$ が非常に高い酸化電位が持つため ($= 2.8 \text{ V/SHE}$) (Latimer 1952)、多くの物質を酸化することができる。 $\cdot\text{OH}$ は、放射線の間接作用の主因として知られている。細胞環境での $\cdot\text{OH}$ の減衰の時定数は約 8.7 ns と非常に短く (Roots et al. 1975)、放射線で生じた $\cdot\text{OH}$ は DNA のデオキシリボース (糖) もしくは塩基が数ナノメートル以内の近傍にある場合には反応できる。 $\cdot\text{OH}$ は反応部位により塩基損傷 (塩基酸化)、AP サイト (塩基脱落) 及び鎖切断などがある (Kobayashi 2017)。

● 水和する前による DNA 損傷

$\cdot\text{OH}$ 以外に、最近では水の放射線分解ラジカルである水和電子の前駆体も DNA 損傷を与えることが分かってきている。2000 年頃に、カナダの Sanche ら

のグループは、15 eV 程度の低エネルギーを持っていた電子が解離性電子付着により、DNA 鎖の塩基損傷を引き起こすことを見出した(Pan et al. 2003)。解離性電子付着とは、物質が電子を捕獲することで励起状態となった陰イオンとなり、どちらかの原子が分子の解離エネルギーより高い電子親和力 (electron affinity) を持つ場合に、分子が解離される現象である。



Uehara らは、モンテカルロシミュレーションより、高いエネルギー粒子線が入射時に得る二次電子のエネルギーを模擬した(Uehara et al. 1999)。生体分子と衝突することで、体内空間では大量の低エネルギー電子 (Low energy electrons、LEE) が放出されることを明らかにした。このことから低エネルギー電子が無視できない重要な役割を果たしていると言える。

また、高エネルギー電子や二次電子がエネルギーを失うことによる、DNA のクラスター損傷の生成に対する模擬を行った報告がある(渡邊立子 et al. 2017, Kai et al. 2018)。電子線が DNA 中に通過する際に発生した二次電子は、半径 1 nm 以内に一本鎖切断や塩基損傷が形成される。生成された二次電子は 10 nm 程度と離れた場所でも、周囲の水分子と作用して塩基損傷を誘発させることが報告された。電子は酸化性でなく重度な DNA 損傷の形成は少ないが、周囲の水分子と反応して水和電子となり塩基損傷が形成させることがあるため、突然変異や発がんのリスクを上昇させることも考えられる。

1.2.3. 活性酸素としての $\cdot\text{OH}$

$\cdot\text{OH}$ は活性酸素の一種でもある(吉川敏一 et al. 2000)。活性酸素 (Reactive Oxygen Species、ROS) とは酸素を含む反応性の高い分子のことで、 H_2O_2 (過酸化水素)、 $^1\text{O}_2$ (一重項酸素)、 O_2^- (スーパーオキシ)、 $\cdot\text{OH}$ (ドヒドロキシルラジカル) などがある。 $\cdot\text{OH}$ は水の放射線分解で生成し、 H_2O_2 は $\cdot\text{OH}$ 同士の再結合によって形成されるため、活性酸素と水の放射線分解の間には緊密な関係もある。

フリーラジカルや活性酸素は人体の代謝で自然に産生される。細胞内のミトコンドリアは酸素を消費し、糖・脂肪・アミノ酸を呼吸鎖の電子伝達反応を絶えず行ない ATP (アデノシン三リン酸) を合成する。ATP 合成のプロセスの一種は酸化リン酸化であり、細胞代謝の中で高効率にエネルギー変換できる経路である。同時に、電子伝達反応の副反応として酸素をスーパーオキシド、過酸化酸素、ヒドロキシルラジカルの順を経て最終的に水へと変換して生成する。この一連の電子伝達反応に最終産物以外は全て活性酸素であり、そのうち数%の活性酸素種は生体内での消去系により還元できるが、そのほかの大部分

はミトコンドリアに損傷を与える。さらに活性酸素消去系の能力を大きく上回った活性酸素が発生した場合、活性酸素は細胞内から漏れ始める。これを酸化ストレスという(岡部弘高 et al. 2007)。活性酸素は細胞膜(脂質)と反応しやすく脂質を毒性の高い過酸化脂質に酸化することで細胞死をもたらす。また、活性酸素による DNA の酸化産物 8-OHdG は老化に伴い増加することで、酸化ストレスのマーカーとしても用いられることが多い。加齢に伴って酸化的に修飾されたタンパク質が増加し、活性の喪失にも相関することが報告されている(Oliver et al. 1987)。酸化ストレスの存在は多くの循環器疾患や心血管病の成因であると見なされている(岡部弘高 et al. 2007)。

1.2.4. 安定な DNA 損傷の形成とその影響

直接作用と間接作用で生じた初期損傷は修復されなかった場合、塩基損傷や鎖切断などとして安定化される。正確な塩基配列は、細胞増殖する際の情報伝達の役割を果たしている。塩基損傷は DNA 上の情報を誤って複製させるため、突然変異につながる。また、リン酸-糖部位での損傷も電子移動により塩基上で固定されることがあり、塩基損傷に注目した先行研究も多い。塩基損傷は一般的に塩基の種類(プリン塩基とピリミジン塩基)に分けて考えることが多い。グアニンとアデニンはプリン塩基で、シトシンとチミンはピリミジン塩基に分類される。 $\cdot\text{OH}$ がプリン塩基と反応すると、プリン塩基の C-8 位に付着し、8-hydroxy-7, 8-dihydropurin-7-yl ラジカルが形成する。グアニンの場合、生成した中間体は酸化により 8-オキソグアニン(8-Oxoguanine)か、イミダゾール環開環化合物であるホルムアミドピリミジン誘導体(FapyGua)を形成する。一方、ピリミジン塩基であるチミンの場合、酸化により C-5、C-6 位の二重結合への OH 付加もしくはメチル基からの OH 媒介の水素引き抜き反応がおこる。酸素分子が炭素中心ラジカルに付加し、最終的には安定なチミジングリコール(ThdGly)、5-ヒドロキシメチルウラシル(HMdUrd)、5-フルオロウラシル(FordUrd)などが生成される。

リン酸-糖部位の DNA 損傷は糖部位の開環構造となり、最終的に鎖切断につながる。 $\cdot\text{OH}$ とデオキシリボースとの反応で最も反応性の高い部位は C-4 位である。また、C-5 位の水素引き抜き反応も酸化生成物の誘導体を生じると報告されている(Douki et al. 2008)。一方、酸素存在下での H-1 位の引抜き反応でもホスホジエステル結合は切断されないが、2-デオキシリボノラクトンなどの酸化損傷の産物が生成される。これらの酸化で生じた生成物は、アルカリ性で不安定となり、最終的には鎖切断をもたらすこともある。

鎖切断は一本鎖切断(Single Strand Break、SSB)や二本鎖切断(Double Strand Break、DSB)に分けられる。SSB は、塩基損傷と同じく反対側の鎖を鋳型として比較的修復されやすい。それに対し、DSB は近い塩基対(10 base pairs

以内) で二つ以上の SSB があるもので、修復が難しくなる。なお、塩基損傷、SSB、DSB の生成収率は約 25 : 25 : 1 と報告されている(Hall et al. 2006, Shikazono et al. 2006)。

鎖切断や塩基損傷が数 nm 以内に複数個ある場合はクラスター損傷 (clustered damage) と呼ばれる。クラスター損傷は除去修復が難しく、また鋳型が少ないため修復時にエラーが生じやすい。高 LET の放射線である粒子線は複雑なクラスター損傷の形成頻度が高くなり、重粒子線がん治療が効果的であることの説明となっている。クラスター損傷が突然変異の誘発頻度を高めることも報告されている(Shikazono et al. 2006)。

1.3. 放射線に対する防護

放射線治療では患部周辺の正常細胞も必然的に放射線に晒されるため、正常細胞への影響も無視できず(Stone et al. 2003)、正常細胞に対してより高度な防護法が求められている。不必要な被ばくを避けるために、物理学的に集中させる手法と薬剤添加で化学的に制御する手法(図 1-3)が考えられている。

1.3.1. 物理学的な防護

物理学的に集中する手法とは、放射線の線量をなるべく悪性腫瘍のみに集中することを示している。X線の場合は皮膚直下に最大吸収線量を持つ特徴がある。多門照射による強度変調放射線治療(Intensity-modulated radiation therapy、IMRT)は、複数の方向から強度の異なる放射線の照射を行うことで線量集中が可能となる。また、画像誘導放射線治療(Image-guided radiotherapy、IGRT)を利用することで治療中の患部や臓器の移動に合わせた照射を行うことも、正常細胞への被ばく低減につながる。更に、線質の特徴を利用し、生体深部に吸収線量が集中する特徴を利用することもある。高LET放射線(重粒子線)の特徴であるブラックカーブを利用することで、皮膚近くより患部近くに線量が集中させることができる。

1.3.2. 化学的な防護(薬剤添加による修飾)

物理学的に吸収線量を制御する手法のほかに、薬剤添加で化学的に制御することもできる。放射線防護剤によって正常細胞への放射線影響を低減することができ、あるいは、増感剤によって腫瘍細胞への放射線影響を増加させることができる。DNAに損傷を与えるラジカルと薬剤中の物質が化学反応することで、正常細胞に対する影響を低減し、またがん細胞に対する損傷を促進する方法である。放射線から生じるラジカルとの反応のため、放射線を照射する前に投与する必要がある。

- 放射線防護剤の開発

放射線防護剤の開発の始まりは、核戦争を想定した第二次世界大戦まで遡る。例えば、アミフォスチン(Amifostine、WR-2721)は初めて臨床使用に承認された放射線に対する防護薬として人工合成された(Kouvaris et al. 2007)。自然由来の抗酸化物質に比べて、人工合成されたものは優れた線量変更因子(dose-modifying factor、DMF)を示している。詳細なメカニズムは全て解明さ

れていないが、これまでに最高の DMF を示したアミフォスチンは FDA（米国食品医薬品局）に認可された唯一の放射線防護剤である。Sasse らの大規模な臨床検証（ $n=1451$ ）では、放射線治療前に投与することで口腔粘膜炎を軽減できると報告されている(Sasse et al. 2006)。しかし、もともと核戦争を想定して開発されたアミフォスチンは、嘔吐などの副作用が強く、放射線がん治療での使用には向いていなかった(Kligerman et al. 1984, Rades et al. 2004)。

原子力の平和利用に伴って、防護剤も放射線治療での使用を主に想定するように移り変わっている。そのため、副作用も可能な範囲で低減されることが求めている。放射線防護剤の主要な働きはラジカル除去作用と考えられており、SH 基やカテコール構造が高い還元性を示している。このことは、放射線防護剤を選定する基準となっている。例えば、アミノ酸の中で唯一 SH 基を持つシステインは細胞内でグルチタオンとして存在し、細胞内の酸化還元状態を調節できると報告されている(Pompella et al. 2003)。

● 抗酸化剤と放射線防護

抗酸化剤は、酸素にかかわっている有害な酸化反応を低減できる薬剤の総称である(Paintner 1980, O'Neill et al. 1993, 吉川敏一 et al. 1998, Nair et al. 2001)。酸化とは電子を奪う反応で、それを阻止する抗酸化反応は電子を授与することが多い。抗酸化剤の作用もラジカルを除去することが多く、放射線防護剤とよく似ている。そのため、天然の抗酸化剤物質を放射線防護剤として利用する可能性が注目されてきた。図 1-4 は代表的な天然及び人工合成の放射線防護剤や抗酸化物質を示している。

生体には酸化に対抗するメカニズムがある。例えば、SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）がスーパーオキシドラジカルアニオン $O_2^{\cdot-}$ を酸素と過酸化水素へ変化させ、カタラーゼは過酸化水素を不均化して酸素と水に変える。これらの酵素の存在は、霊長類が一般の哺乳類よりも長寿化した原因と言われ、人間が酸化に対抗する物質の摂取も人間の長寿化に大きく役立っている。例えば、水溶性抗酸化剤であるビタミン C やポリフェノール（フラボノイドはその一種）は細胞内外で酵素が処理しきれない活性酸素やフリーラジカルを捕捉し、脂溶性抗酸化剤であるビタミン E は細胞膜で脂質過酸化反応の連鎖を止める作用が報告されている(吉川敏一 et al. 1998)。

● 抗酸化剤による放射線防護のメカニズム

放射線防護剤の添加による放射線由来の DNA 損傷軽減は、薬剤がラジカルと反応して除去するラジカル捕捉に注目されることが多い。抗酸化剤が $\cdot OH$ と反応して、比較的安定なラジカルを生成する反応は次のように表せる。



ここで、A は抗酸化剤、R はラジカル、P は比較的安定なラジカルを意味し、それぞれの濃度が[A]、[R]、[P]とすると、生成する比較的安定なラジカル P の濃度は時刻 t として、

$$\frac{d[P]}{dt} = k[A][R] \quad (1-3)$$

と表現できる。ここで、 k は反応速度定数である。

$\cdot\text{OH}$ の減衰は生体内では 8.7 ns 程度と報告される(Roots et al. 1975)。数 ns 以内にラジカル捕捉しない限り DNA 損傷形成に影響を与えられないと仮定すると、ラジカルと反応させる薬剤の濃度は数 M と高濃度にする必要がある。アスコルビン酸の経口投与の半致死量は、ラットでは 11900 mg/kg (約 68 mM に対応) と知られている。高濃度の抗酸化薬剤を摂取すると、ラジカルを捕捉する効果は高まるものの、一方で生体内の細胞や組織に強い毒性を与えることになる。つまり、ラジカルを抗酸化薬剤が捕捉する反応だけでは、放射線防護効果に対する説明としては不十分であった。

近年では、ラジカル捕捉以外に、化学回復による DNA 損傷の低減が提唱されている(Hall et al. 2006)。Anderson らは、パルスラジオリシス法より光吸収の挙動を観測し、微量の抗酸化剤添加で、生成物の吸光変化があることを報告されている(Anderson et al. 2000)。このプロセスは化学回復と呼ばれ、放射線で生じた初期 DNA 酸化損傷をゆっくりと還元して回復させることを意味している。具体的には、電子や水素原子の供給により回復させると考えられる (図 1-5)。細胞内に存在する少量の放射線防護剤では、ほとんどの $\cdot\text{OH}$ を除去できず、ラジカル除去よりも化学回復のほうが効果的と考えられる。さらに、化学回復による放射線影響の低減は、放射線の直接作用と間接作用を問わずに期待できる。

1.3.3. 生物学的な防護 (DNA 損傷の修復)

生体は生存のために代謝を行い、活性酸素が絶えず体内に生成されている。活性酸素は継続的に DNA と反応して損傷を引き起こしており、このため生体には DNA 損傷を修復する巧妙な仕組みを備えられている。

塩基損傷は塩基だけを切り出す塩基除去修復 (BER、base excision repair)、または塩基部位を含めた部分を切り出してギャップ部分の DNA を再合成するヌクレオチド除去修復 (NER、nucleotide excision repair) により修復できる。例え

ば、塩基修復酵素の Fpg (Formamidopyrimidine (Fapy) -DNA glycosylase) では N-グリコシラーゼ (N-glycosylase) によりプリン塩基損傷である 8-oxo-Gua を除去して塩基脱離部位 (apurinic/aprimidic site、AP 部位) を作り、さらに AP リアーゼ (AP-lyase) で 3' と 5' 両方の AP 部位を切断して、AP 部位を除去し、塩基ギャップを残す。これにより DNA の塩基損傷が SSB と同じ形となって、鎖切断と同じく DNA 再合成により修復可能となる。

鎖切断の修復は SSB と DSB で異なる。SSB の修復は組換え修復を利用する。組み換え修復とは、DNA が複製した時に損傷箇所の複製を行わずにギャップを作り、組換えにより損傷ギャップを埋め込む修復である。DSB の修復には相同組換え (homologous recombination: HR) と非相同末端再結合 (Non-Homologous End-Joining: NHEJ) が存在する。

損傷が適切に修復できない場合、細胞死や突然変異につながる。大量の細胞死は急性的な病変で個体の命に危機を与え、突然変異は晩発影響となり個体の生存や子孫の繁栄などに危機を及ぼす可能性がある (図 1-1 に参照)。

1.4. フラボノイドとルチン

1.4.1. フラボノイドとその生体への作用

フラボノイド (flavonoid) は天然に広く存在する抗酸化物質である。フラボノイドとは、広義には二つのフェニル基が三つの炭素原子を介して結合した化合物の総称で、C6-C3-C6の炭素フレームワークがあるものと定義される (Okawa et al. 2001)。図 1-6 にフラボノイドの主要骨格を示す。I ベンゼン (A 環) とピラン (C 環) が縮合してクロメン (chromene) 構造となり、UPAC 命名法では、フェニル基 (B 環) の結合位置で Flavonoids (2-phenylchromen)、Isoflavonoids (3-phenylchromen)、Neoflavonoids (4-phenylchromen) と分類されている (McNaught et al. 1997)。

フラボノイドの基本構造であるフラバン (Flavans) は C 環 4 位にケトン構造がもっているものが多い (Flavan-4-ones)。また、C 環 3 位のヒドロキシ基と C 環 2、3 位間の二重結合の有無より更に細分化される。フラボノイド類は A 環 5-8 位及び B 環 2-6 位 (R_1' - R_5' の部分) にヒドロキシ基やメチル基を導入でき、また C 環 3 位及び A 環 7 位のヒドロキシ基とグリコシド結合 (グルコースを脱水結合) させることで、糖鎖も導入できる。天然のフラボノイドだけでも 38,400 種類以上あり、糖鎖導入などの要素を考慮するとフラボノイドには極めて豊富なバリエーションがある。

フラボノイドに関する研究は骨格構造の分析が主流である。フラボノイドの物理学的及び化学的性質は C 環 2、3 位の間での二重結合の有無に影響される。この二重結合をもつフラボノール及びフラボン類は、340 nm より長波長側に吸収ピークを持つ (吉川敏一 1998)。

フラバノン類はフラバノン 3-ヒドロキシラーゼによりフラバノール類になり、フラボノール合成酵素により酸化されて最終的にフラボノール類となる。一方、フラボン合成酵素が働くと、フラバノン類はフラボン類に酸化される。主にこの二つの合成経路から、フラボノイドの約 4 割を占めているフラボノール類とフラボン類が天然または人工的に作り上げられる (図 1-7)。

フラボノール類は 360 nm 付近に吸収極大があり、黄色を呈するものが多い。一方、フラバノン類は 280 および 340 nm 付近に吸収極大があるものの、340 nm 付近の吸収ピークは小さいため無色に近い。これらのフラボノイドは野菜、果実、豆などの農産物に配糖体として存在している。フラボノール類は、ほとんどの野菜や豆に含まれており、種類も多数存在する。

フラバノン類とフラボノール類は抗酸化効果が高く、放射線防護効果も期待できる。特にフラボノール類は C 環 2、3 位に OH 基を持ち、3 位の水酸基があることで、ほかの構造よりもラジカル捕捉能 (抗酸化性) が高いことが報告されている。 (Rice-Evans et al. 1996)。そのほか、フラバノン類およびフラボノール

ルチン類には抗変異原性やがんのプロモーション抑制作用、アポトーシスの誘導作用なども報告されている(吉川敏一 1998)。

1.4.2. ルチンとその配糖体

ルチン (quercetin-3-O-rutinoside) はフラボノール類ケルセチンの配糖体で、蕎麦やオリーブなど、多くの天然食料品に含まれる。構造的には高い放射線防護効果を期待できるが、親水性が低いため (溶解度は約 12.5 g / 100g で約 20 mM に対応) 効率よく摂取することは困難であった。近年、ルチンに糖鎖 (グルコシル基) を導入した α G ルチンが開発され、水溶性が 30,000 倍以上に増加したと報告されている(Suzuki et al. 1991)。ルチンと α G ルチンの構造を図 1-8 に示す。 α G ルチンは天然ルチンと比べ、*in vivo* 研究では吸収効率の向上 (Matsumoto et al. 2005)や体内での残留時間の改善(Shimoi et al. 2003)も確認されている。

また、糖鎖の導入は突然変異誘発頻度に影響する可能性も報告されている。Hardigree らはケルセチンが培養細胞に高い致死作用を持ち、突然変異誘発性物質であると報告している(Hardigree et al. 1978)。しかし、Sunada らによると、ケルセチンの毒性を低減させ、放射線に対する防護効果も損なわれないことが報告されている(Sunada et al. 2014)。

1.5. ルチンの放射線防護の既往研究

ルチンによる放射線作用への影響の研究は 1947 年までに遡る。ルチンの微量添加により照射後のラットの脚が正常状態に回復するまでの時間が早まることが報告されている(Griffith Jr et al. 1947)。近年では分子化学・分子生物学の進歩に伴い、ルチンの生体内での挙動や分子構造の解析も進められてきている。

1.5.1. 分子機能の検討

Kessler らは、20 種類のフラボノイドのラジカル除去能及び脂質過酸化反応の抑制効果を評価した(Kessler et al. 2003)。Rekka らは、6 種類のフラボノイドの DPPH ラジカルの除去及び脂質過酸化反応（フリーラジカルが細胞膜の脂質から電子を奪い、細胞への損傷を与えた後に、酸素分子によって過酸化される反応のこと）の抑制を評価し、 $\cdot\text{OH}$ との反応速度定数を概算した(Rekka et al. 1991)。また van den Berg らは、5 種類のフラボノイドのラジカル除去能を Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) より評価し、脂質過酸化反応の抑制を評価した(van den Berg et al. 2000)。Robak らは、7 種類のフラボノイドと 3 種類の非フラボノイドを使い、スーパーオキシドラジカルアニオンに対する阻害効果を調べた(Robak et al. 1988)。Nanjo らはカテキン類 18 種類を、DPPH ラジカル除去能から構造的な要因を調べ、C 環 3 位のグルコガリン部位と B 環のオルトトリヒドロキシル（ベンゼン環にヒドロキシ基が 3 個置換した化合物）構造がラジカル除去と強い相関を持つことを報告した(Nanjo et al. 1996)。ベンゼンジオールの場合（ベンゼン環にヒドロキシ基が 2 個結合した化合物、例えばカテコール構造）はアルカリ性領域ではラジカル除去能が低く、これは酸化還元電位の差に帰着したと報告されている。

上記した報告によりフラボノイドの構造によるラジカル除去能が以下のように説明される。

- (1) C 環 3、4 位のヒドロキシ基により生成されたカテコール構造は高いスーパーオキシドの捕捉能を示す(Moridani et al. 2003)。
- (2) C 環 2、3 位での応答は明瞭でないが、二重結合によってラジカルの捕捉能を増加させる可能性がある(吉川敏一 1998)。
- (3) 細胞膜への透過（親油性）を考慮し、C 環 7 位及び C 環 3 位に官能基置換することが望ましいが、C 環 7 位のヒドロキシ基はスーパーオキシドの捕捉能にあまり影響しない(Kessler et al. 2003)。

1.5.2. 細胞や動物実験での応用

Agarwal らは *in vivo* 実験で、全致死線量まで照射したマウスでもフラボノイドの添加により生存時間が延長し、そのうちルチンが最も有効であることを報告した(Agarwal et al. 1981)。Shimoi らは γ 線照射前に胃挿管で 12 種類のフラボノイドを投与し、抗酸化活性を調べた(Shimoi et al. 1994)。抗線維形成活性は抗酸化活性と相関があり、フラボノイドの放射線防護効果が $\cdot\text{OH}$ 除去能に関連していると示唆された。Patil らはルチンもしくはケルセチンを微量添加したスイスアルビノ系統マウスに ^{60}Co を照射し、マウス体内のグルタチオン (GSH)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、および脂質過酸化 (LPO) などの指標レベルの変化を測定した(Patil et al. 2013, Patil et al. 2014)。GSH、SOD 及び CAT は体内の活性酸素を除去する酵素類のことで、LPO のレベルを高い際は細胞膜にダメージが生じることが知られている。GSH、SOD、CAT、LPO のいずれも照射により変化したが、ルチンの投与でその変化は抑制された。そのことから、ルチンは体内の活性酸素を除去し、また細胞膜へのダメージも低減できるといえる。

1.6. 本研究の目的と論文構成

ルチンはいラジカル捕捉能というポテンシャルがあるため放射線防護効果が期待できる。しかしながら、細胞実験での結果がすべて解釈できているとは言い難い。また、グルコシル基を導入して水溶性を向上した α G ルチンについての研究は少ない。更に生体環境で想定される低濃度の抗酸化剤添加した際の影響もまだ解明されていない。

本研究は抗酸化剤として α G ルチンに注目し、抗酸化剤の放射線防護基礎過程を解明することを目的とした。以下の実施項目より特に生化学的レベルで検討した。

- (1) 短時間領域における抗酸化剤と水分解ラジカルとの反応挙動のパルスラジオリシス法による測定
- (2) 放射線由来の DNA 変異の電気泳動法による検出及び定量

第一章では放射線影響と放射線防護についての研究史を振り返り、放射線由来の DNA 損傷の種類、及びそれらの損傷に対抗するための物理・化学・生物・医学での対抗手段を概説した。

第二章では、短時間領域 (ns-ms) に着目し、抗酸化剤ルチン及びその配糖体である α G ルチンによる放射線防護効果を、パルスラジオリシス法によって観測している。これまでに明らかでなかった抗酸化剤と水の放射線ラジカルとの反応や、酸化された DNA ラジカルを還元し直す反応を直接観測することで防護のメカニズムを明らかにしていた。

第三章では、抗酸化剤の微量添加の効果を調べるために、安定な DNA 損傷の検出手法を改良した。大腸菌由来のプラスミド DNA を透析により高純度化させたほか、放射線の直接作用と間接作用のそれぞれに由来する損傷の検出を試み、線質依存性も検討した。

第四章では、第三章で確立した手法のもとに、抗酸化剤の微量添加効果を調べた。直接作用と間接作用に対し、抗酸化剤は鎖切断や塩基損傷といった損傷をどのように低減したのかを調べ、抗酸化剤の放射線防護剤としての特徴を抽出した。

第五章では、結論と今後の展望を説明した。

最後に付録で、実験の詳細プロトコルを添付した。

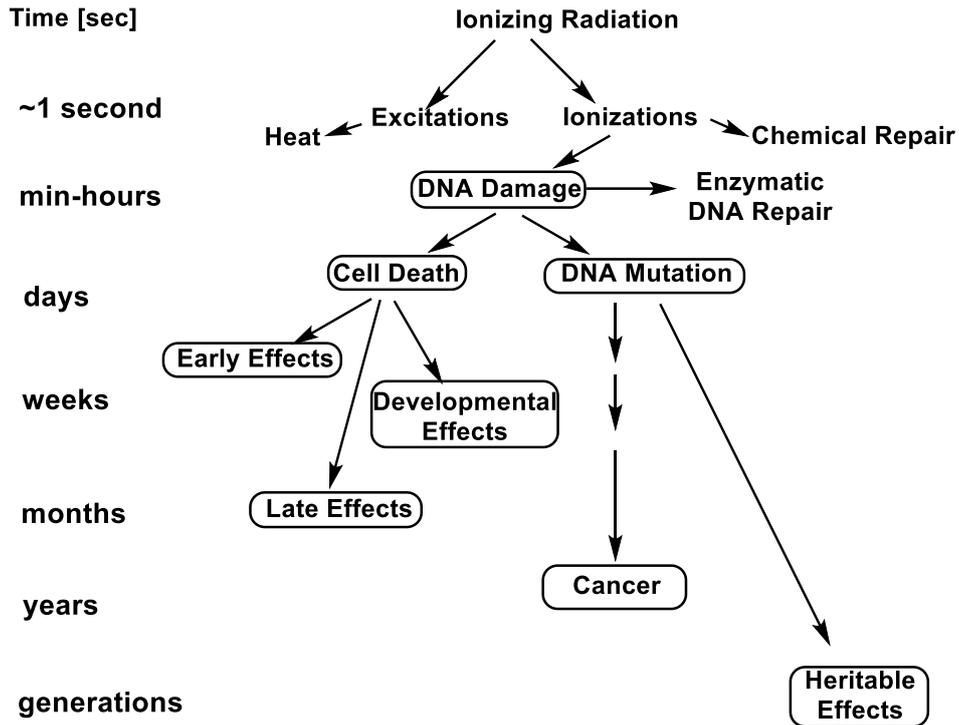


図 1-1 放射線が誘発する生体影響の進展

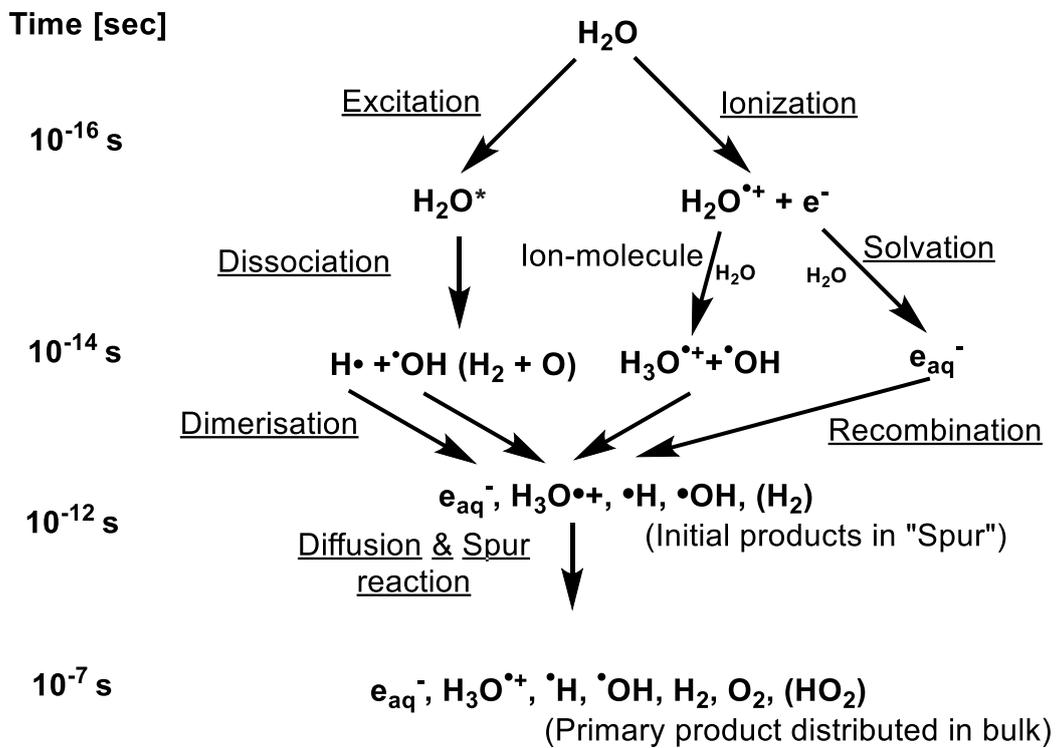


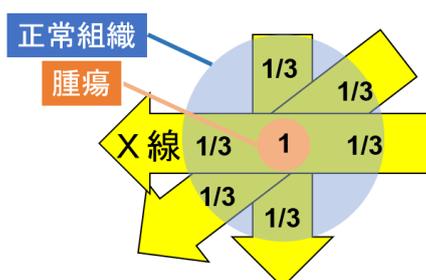
図 1-2 水の放射線分解の初期過程

表 1-1 水の放射線分解におけるプライマリ収量の線質による違い(工藤久明 2011)

線質 (LET)	プライマリ収量(molecules / 100 eV)				
	$\cdot\text{OH}$	e_{aq}^-	$\text{H}\cdot$	H_2	H_2O_2
x-ray (0.23 eV/nm)	2.63	2.72	0.55	0.45	0.68
12 MeV He^{2+} (108 eV/nm)	0.42	0.54	0.27	1.11	1.08

物理学的な対策

正常細胞の被ばく低減
(例えば多門照射)



生化学的な対策

薬剤による修飾
(増感と防護)

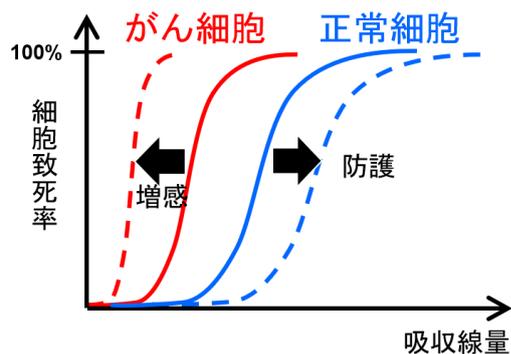


図 1-3 放射線がん治療での正常細胞への低減方策

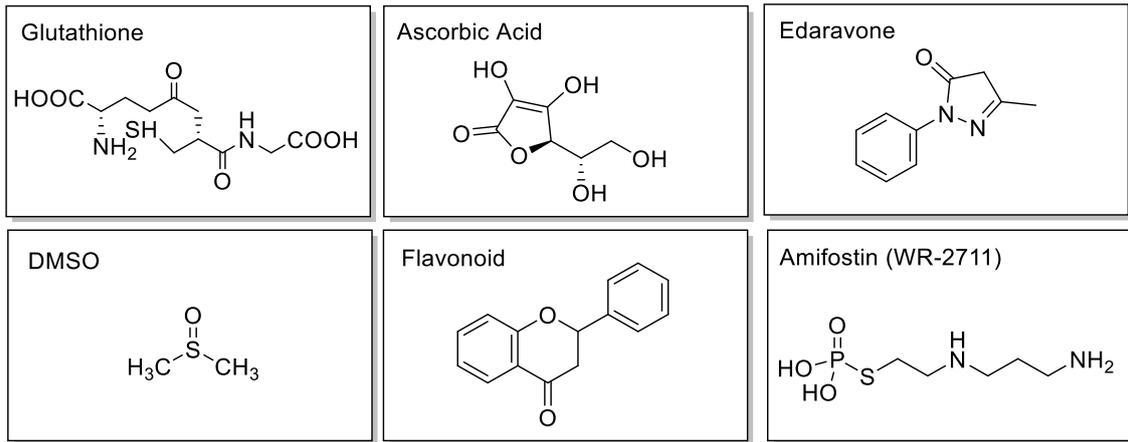


図 1-4 代表的な放射線防護剤と抗酸化剤

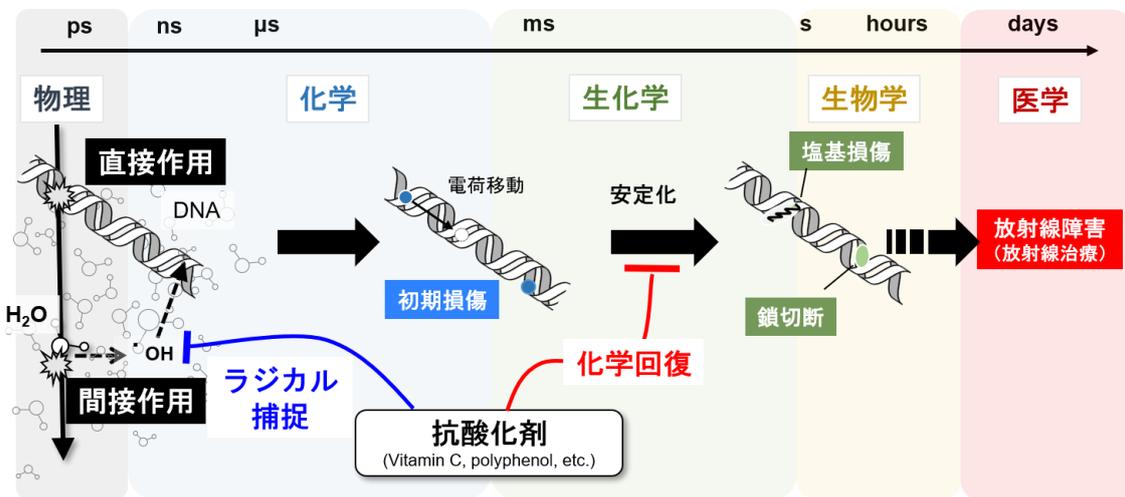
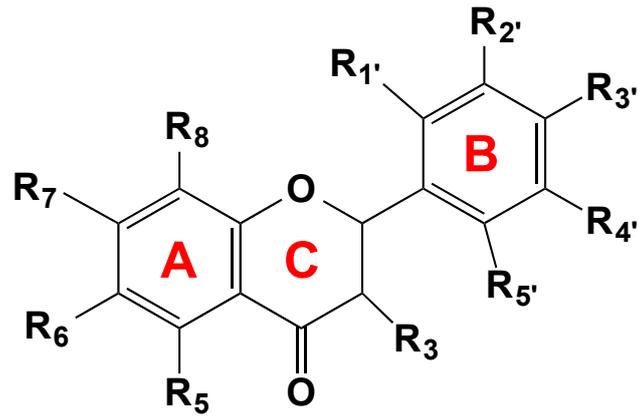


図 1-5 抗酸化剤添加による DNA の変異誘発への影響



$R_1 \sim R_8, R_{1'} \sim R_{5'} : H/OH/OCH_3, \text{ etc.}$

図 1-6 フラボノイドの主要骨格

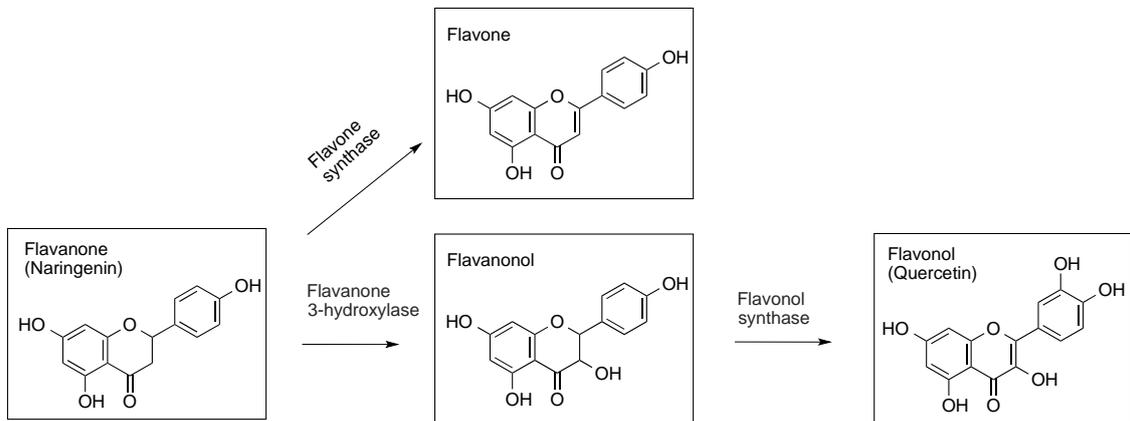


図 1-7 フラバノンからフラボノールへの生合成

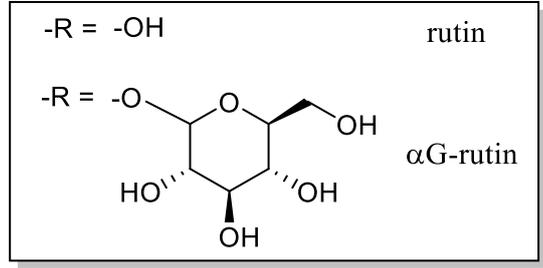
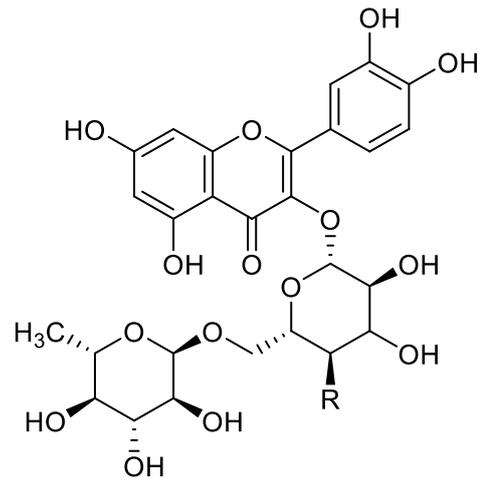


図 1-8 ルチンと α G ルチンの化学構造式

第2章 パルスラジオリシス法による 放射線防護初期過程の直接観測

抗酸化剤の微量添加効果にはラジカル捕捉と化学回復が存在する。水の放射線分解ラジカルの反応はナノ秒からマイクロ秒領域で起こり、このような短時間領域での挙動をパルスラジオリシス法では光吸収の変化から検出できる。

なお、本章の内容は原著論文として出版された(Yu et al. 2019)。

2.1. パルスラジオリシス法と本章の目的

パルスラジオリシス法の概要及びその日本における発展は、以下の文献を参照されたい(Uesaka et al. 2011, 楊金峰 et al. 2015)。1962年にエネルギー1.8 MeV、パルス長さ 3 μ s のパルスを用いたパルスラジオリシス実験が行われた。可視光領域の 700 nm 付近に強い光吸収が見られ、後にそれが水和電子であると確認された(Hart et al. 1962)。以来、パルスラジオリシス法は放射線で生成された短寿命の中間活性種（中間生成物）を測定する最も有効なツールとなっている(楊金峰 et al. 2017)。パルスラジオリシス法は吸光度の変化から、中間生成物の種類やその反応挙動を *in-situ* で定量評価できる(von Sonntag 1987)。一般的に DNA は 260 nm に吸光があり、DNA の酸化ラジカルも可視光で検出できるため、パルスラジオリシス法は DNA 損傷の同定にも有効である。しかし、高分子の DNA を含む試料は光の透過性が低く、モデル物質として塩基やヌクレオチド、場合によってはオリゴマーが用いられる。近年では、電子銃とビーム信号の同期技術の向上より、ns 以下のピコ秒 (ps) 領域での吸収変化の検出も可能となってきている。例えば、Ma らの研究では、7 ps の電子線パルスを利用し、溶媒和前電子がヌクレオチド (5-メチルウリジン) と反応し、グリコシド結合を破壊するプロセスの観測に成功している(Ma et al. 2019)。このように、パルスラジオリシス法は水分解ラジカルと DNA の反応挙動など、放射線作用の初期過程を *in-situ* で直接観測できる。

微量の抗酸化剤添加濃度は概ね μ M-mM の範囲であることを踏まえ、抗酸化剤と放射線水ラジカルとの反応速度が概ね $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であることから概算すると、反応の起こる時間スケールは μ s-ms 程度となる。これまでエダラボン(Hata et al. 2011, Hata et al. 2015)、アスコルビン酸(O'Neill 1983)、フラボノイド類 (シリビン(Fu et al. 2009)、ケルセチン(Anderson et al. 2000)、カテキン(Anderson et al. 2000)) など、いくつかの抗酸化剤についてパルスラジオリシス法を用いた研究がされてきた。ラジカル捕捉と化学回復は、放射線防護の放射線防護基礎過程であり、抗酸化剤の防護メカニズムを調べるために観測することが望まし

い。しかし、観測の技術的な制約のため、必ずしも完全に観測、解明できているとは言えない。特に化学回復の観測は難しく、いまだに明瞭な観測結果がほとんどない。

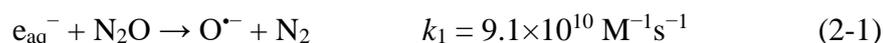
本章では、特に化学回復を直接観測することを重視しつつ、抗酸化剤の放射線防護効果を解明することを目的としている。パルスラジオリシス法によって、*in vitro* の条件で以下の反応を観察した。

- (1) ルチンまたは α G ルチンと水の放射線分解ラジカルとの反応
- (2) ルチンまたは α G ルチンと dGMP ラジカルとの反応

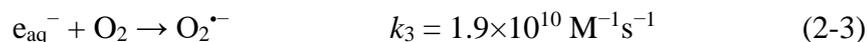
2.2. 実験方法

2.2.1. サンプル調製

水和電子 (e_{aq}^-) と OH ラジカル ($\cdot OH$) は水の放射線分解で生じる最も主要な初期生成物である。 $\cdot OH$ との反応を観察するために、試料を 15 分以上の N_2O ガスでバブリングした。 N_2O は溶解度が高く (25 mM)、次の反応を引き起こし、 e_{aq}^- を $\cdot OH$ に変換させることができる。



水和電子との反応を観察するために、サンプル試料中に酸素が残存していると、 e_{aq}^- と以下の反応が起こってしまう。そこで、20 分以上 Ar ガスでバブリングして酸素を追い出した。



さらに *t*-BuOH を利用し、以下の反応で $\cdot OH$ を除去した。



また、反応メカニズムを検討する上で、アジドアニオン (N_3^-) を使用し、以下の反応で $\cdot OH$ をアジドラジカル (N_3^{\cdot}) に変換させた。



なお、式 2-1 から 2-5 までの反応速度定数は、Buxton らの研究結果を参照した (Buxton et al. 1988)。

抗酸化剤は天然フラボノイドの一種であるルチンとその配糖体 αG ルチンを利用した。 αG ルチンはルチンに一個のグルコシル基が導入されたものである。ルチンまたは αG ルチンと $\cdot OH$ との反応の速度定数を決定する際には、ヨウ素イオン (I^-) を競争相手とした競合反応法を用いた。

グアニンは核酸塩基の中で最も低い還元電位 (Steenken et al. 1997) をもち、最も酸化されやすい (Milligan et al. 2001)。グアニンのヌクレオチドである dGMP

(デオキシグアノシンーリン酸)は高分子である DNA の単量体であり、モデル物質として使用した。dGMP 水溶液の pH 値を 6.8 程度に維持するために、 $\cdot\text{OH}$ との反応をほとんど無視できるリン酸緩衝剤を 10 mM 濃度で添加した。

ルチン (quercetin 3-O-rutinoside)、*t*-BuOH (*tert*-butyl alcohol)、リン酸二水素一ナトリウム (NaH_2PO_4)、リン酸一水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) とアジ化ナトリウム (NaN_3) は、富士フィルム和光純薬株式会社 (日本大阪) から購入した。ヨウ化ナトリウム (NaI) およびデオキシグアノシンーリン酸 (dGMP) は、それぞれ Thermo Fisher Scientific 社 (米国マサチューセッツ州) および Sigma-Aldrich 社 (米国ミズーリ州) から購入した。 αG ルチンは、東洋製糖株式会社 (東京、日本) のご好意のもとに提供して頂いた。ルチンと αG ルチンの純度は 90% 以上、 NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の純度は 98.0% 以上、その他の試薬の純度は 99.0% 以上であった。すべての化学物質は精製せずに使用した。超純水 ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) は Merck 社 (米国ニュージャージー州) の Milli-Q システムから供給されたものを用いた。

2.2.2. パルスラジオリシス

パルスラジオリシスは、東京大学大学院工学系研究科原子力専攻 (東海村キャンパス) の電子線加速器施設 LINAC において実施した。パルス幅は 10 ns、エネルギーは 35 MeV の電子ビームを用いた。時間分解光吸収分光システムは、レンズ、ミラー、Xe フラッシュランプ、光学フィルター、モノクロメーター、PIN フォトダイオード、デジタルオシロスコープなどで構成されているものを用いた。装置の詳細は文献(Hata et al. 2011)を参考されたい。吸収線量は、10 mM KSCN の N_2O 飽和水溶液 (チオシアン線量計) で測定した(Buxton et al. 1995)。パルスあたりの吸収線量は、反応速度定数を決定する場合は 0.8-0.9 Gy、その他は 7-12 Gy の範囲内であった。

2.3. 結果と議論

2.3.1. $\cdot\text{OH}$ との反応 (ラジカル捕捉)

図 2-1 に、 $\cdot\text{OH}$ とルチン (20 μM) または αG ルチン (100 μM) との反応で観察された過渡吸収スペクトルを示す。パルスあたりの吸収線量はルチンの場合は 11.4 Gy、 αG ルチンの場合は 9.0 Gy であった。ルチンと αG ルチンはもともと紫外線 (UV) 領域に吸収があるため、370 nm より短い波長は光が透過せず、過渡吸収は観察できなかった。ルチンと αG ルチンともに 3 つの吸光ピークが観測された。まず、400 nm にシャープなピークと 550 nm にブロードなピークが観測され、のちに 400 nm のピークが 440 nm にシフトした。550 nm のピークは時間が経ってもシフトしなかった。

吸光ピークの挙動から、少なくともルチンと $\cdot\text{OH}$ との反応に、異なる 3 つの生成物があることを示唆された。 $\cdot\text{OH}$ による酸化には、一般的に OH 付加反応、電子引き抜き反応、及び水素引き抜き反応がある。三つの吸光ピークがあることは、これらの反応の生成物に対応すると考えられる。生成物を特定するために、 $\text{N}_3\cdot$ と αG ルチンの反応における過渡吸収スペクトルを観察した (7.6 Gy/pulse)。これを図 2-2 (a) に示す。 $\text{N}_3\cdot$ は、主に電子引き抜き反応を引き起こすことが知られている。1 μs の時点で、400 nm 付近に 1 つ目のピークが見られた。そのピークが 40 μs 以内に 440 nm に徐々にシフトした。このことから 400 および 440 nm のピークは、ルチン (αG ルチン) が一つの電子を失った状態でのカチオンラジカル (αG ルチン $^{+\cdot}$) と水素原子を失った (脱プロトン化) 状態での中性ラジカル (αG ルチン(-H) \cdot) にそれぞれ対応していることが示唆される。540 nm では前者の吸光の影響を受けていないため、そのビルドアップ挙動から計算すると、脱プロトン化プロセスの速度は約 $3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ と見積もられた。

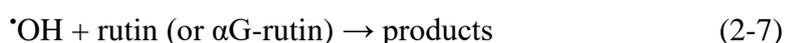
中性ラジカルは、 $\cdot\text{OH}$ による水素引き抜き反応で直接生成されることも考えられるが電子移動のほうが優先的に起こると考えられる (図 2-2 (b) 参照)。図 2-1 で観察されたもう 1 つのピーク (550 nm) は図 2-2 (a) では見られなかった。これは、 $\text{N}_3\cdot$ との反応から得られない $\cdot\text{OH}$ の付加反応の生成物とみられる。ルチンの場合も同様の観測結果が得られた。

図 2-1 の 400 nm でのピークの高さは、ルチンの場合が約 0.035 であり、 αG ルチンの約 0.055 よりも小さかった。これは、溶解度の違いによって説明できる。ルチンの溶解度が低いため 20 μM 程度の低濃度試料であったのに対し、 αG ルチンはその 5 倍 (100 μM) で実験した。両方の薬剤が $\cdot\text{OH}$ に対して同じ速度定数を持っていると仮定すると、ルチンの反応速度 (つまりラジカル捕捉能、 s^{-1}) は αG ルチンの反応速度より 5 倍遅くなると試算できる。拡散律速 (約 $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) の反応ならば、両反応の反応時間は、ルチンは 5 μs となり、

α G ルチンは 1 μ s と推定される。400 nm の吸光ピークのある生成物は、ルチンと α G ルチンのカチオンラジカルであり、のちに脱プロトンして中性ラジカルとなる生成種が考えられる。脱プロトン化は通常一次の反応速度論に従い、ルチンおよび α G ルチンの濃度には影響を受けないと推測される。したがって、ルチンの 400 nm のピークは、吸収の立ち上がりが完了するまでに減衰し始めるため、ピークの高さが低くなったと解釈できる。実際に、ルチンと α G ルチンの 440 nm でのピーク高さはそれほど大きくなく（それぞれ約 0.032 と 0.038）、その僅かな差はルチンと α G ルチンの \cdot OH に対する捕捉能の差に依存する。いずれにしても、ルチンと α G ルチンの両方とも 3 つのピークが共通しており、反応サイトは導入したグリコシル基ではなく、主骨格である共通構造であると示唆される。

2.3.2. dGMP \cdot との反応（化学回復）

化学回復を観察するために設計した反応スキームの概要を図 2-3 に示す。ほとんどの \cdot OH が dGMP と反応して dGMP ラジカルが形成され、その後 dGMP ラジカルが微量のルチンまたは α G ルチンによってゆっくりと化学回復されることが観察できると考えた。このために、dGMP に対してルチンまたは α G ルチンの濃度の比率を丁寧に計算し、制御する必要があった。dGMP とルチンは、次の 2 つの反応で互いに競争して起こる。



式 2-6 の反応速度定数は Ebert らの結果を参照した(Ebert 1965)。式 (2-7) の速度定数 k_7 は、ルチンと α G ルチンでそれぞれ $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{10}$ および $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定された (2.3.3 参照)。競争反応の分岐比は、ラジカル捕捉能（速度定数と捕捉剤濃度の積）に比例する。 \cdot OH に対する 1.5 mM dGMP のラジカル捕捉能は $1.0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ であり、10~20 μ M ルチンおよび 50~100 μ M α G ルチンのラジカル捕捉能はそれぞれ $1.0 \times 10^5 - 3.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 及び $4.5 \times 10^5 - 1.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ となる。この条件では 90% 以上の \cdot OH がまず dGMP と反応し、その時間スケールはラジカル捕捉能の逆数から 0.1 μ s と見積もられる。

図 2-4 (a) は、 \cdot OH と 1.5 mM dGMP の反応で観察された過渡吸収スペクトルである。まずルチンまたは α G ルチンを添加していない場合、300 nm にシャープなピークと 390 nm にブロードなピークがある。これは先行研究の報告と一致しており、dGMP ラジカルが生じている(Fu et al. 2008)。次に 100 μ M α G ル

チンを添加すると、440 nm に新しいピークが現れた (図 2-4 (b))。図 2-4 (a) と (b) は異なる日に得られたデータであり、パルスあたりの吸収線量は 9.2 Gy と 9.4 Gy であることに注意されたい。新しく現れたピークの形は、 α G ルチンと $N_3\cdot$ の反応で観察された 440 nm のピークの形状と非常に近似しており (図 2-2 参照)、中性ラジカル α G ルチン(-H) \cdot であると示唆される。したがって、dGMP ラジカルに水素原子を与えることにより、 α G ルチンが中性ラジカルになったと考えられる。つまり、dGMP ラジカルは次のような反応で α G ルチンに化学回復されたと考えられる。



図 2-6 には、この波長 (440 nm) におけるビルドアップ挙動を示している。添加したルチンおよび α G ルチンの濃度と明らかに相関がある。次式でデータを近似し、速度定数を推定した。

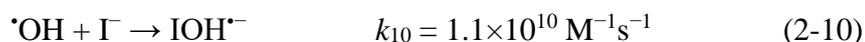
$$y = A + B \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right\} \quad (2-9)$$

ここで、 y は 440 nm での吸光度を吸収線量で割った値、 A は 1 μ s 以内の $\cdot\text{OH}$ との反応によって生成された dGMP ラジカル吸収に対応するアジャスタブルなパラメータ、 B は α G ルチン (-H) ラジカル吸収に対応するもう一つのアジャスタブルなパラメータである。 t は時間、 τ は反応の時定数である。時定数を反応の時間スケール、つまり捕捉能の逆数とみなし、dGMP ラジカルに対するルチンおよび α G ルチンの速度定数は、それぞれ $(9\pm 2)\times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 及び $(6\pm 1)\times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と評価された。

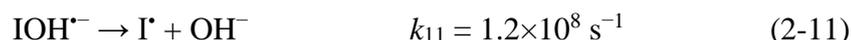
2.3.3. ラジカル捕捉の反応速度定数の評価

図 2-1 に見られるように、 $\cdot\text{OH}$ とルチンまたは α G ルチンの反応の生成物は、過渡吸収スペクトルは形状が一定でないため、どの波長においても立ち上がり挙動から反応の速度定数を推定することは困難である。このため、競争反応法を用いた。最も広く使われている競争相手である SCN^- は、生成物 $(\text{SCN})_2\cdot^-$ の吸収は 472 nm 付近であり (Buxton et al. 1995)、ルチンと $\cdot\text{OH}$ の反応の生成物のバンドが重なるため使用できない。I $^-$ を競争相手として用いたのは、 $\cdot\text{OH}$ との反応の生成物が 740 nm 付近のより長い波長で比較的安定した吸

収を持つためである(Elliot 1992, Muroya et al. 2017)。 $\cdot\text{OH}$ とヨウ化物アニオン (I^-) の反応でヨウ素ラジカル (I^\cdot) が得られる(Buxton et al. 1988)。



$\text{IOH}^{\cdot-}$ は速やかに I^\cdot と OH^- に解離する(Elliot 1992)。



さらに、ヨウ素ラジカルは近傍のヨウ化物アニオンと反応し、360 および 740 nm に吸収ピークを持つ二量体ラジカルアニオン ($\text{I}_2^{\cdot-}$) が生成される(Elliot 1992)。



k_{12f} と k_{12b} は、それぞれ順反応と逆反応の速度定数である。

ルチンまたは αG ルチンとヨウ素イオン (I^-) の捕捉能の和が異なると、 $\cdot\text{OH}$ を除去する時間スケールが異なり、速度定数の計算が困難となる。そこでルチンと αG ルチンの反応速度が拡散律速であると仮定し、ルチンとヨウ素イオンの比率が変わっても各試料の捕捉能がほぼ一定となるようにした。パルスあたりの線量は 7.3 Gy 以下で、10 回以上吸光度を測定し、その平均値を図 2-6

(a) にプロットした。ルチンまたは αG ルチンの I^- に対する濃度比が増加すると吸光度は減少していることが分かる。この吸収の大部分は $\text{I}_2^{\cdot-}$ によるもので、図 2-1 に示すように、ルチンまたは αG ルチンと $\cdot\text{OH}$ の反応の生成物もこの波長に若干の吸収を持つため、観測される吸光度は、次式のように 2 つの生成物の吸収の合計で表す。

$$\text{Abs} = \varepsilon_{\text{ruin}} [\cdot\text{OH}]_{\text{ruin}} l + \varepsilon_{\text{I}^-} [\cdot\text{OH}]_{\text{I}^-} l \quad (2-13)$$

ここで、 Abs は吸光度、 $[\cdot\text{OH}]_{\text{ruin}}$ と $[\cdot\text{OH}]_{\text{I}^-}$ はそれぞれルチンと I^- に捕捉される $\cdot\text{OH}$ の濃度、 $\varepsilon_{\text{ruin}}$ と ε_{I^-} はそれぞれルチン及び I^- との反応の生成物のモル吸光係数である。 ε_{I^-} は文献を参照した(Muroya et al. 2017)。 l は光路長である (2.0 cm)。前述のように、競争反応の分岐比は捕捉能に比例する。したがって、次の関係が成り立つ：

$$\frac{[\cdot\text{OH}]_{\text{rutin}}}{[\cdot\text{OH}]_{\Gamma}} = \frac{k_{\text{rutin}}[\text{rutin}]}{k_{\Gamma}[\Gamma]} \quad (2-14)$$

ここで、 k_{rutin} と k_{Γ} はそれぞれ反応 rutin 及び Γ の $\cdot\text{OH}$ に対する反応の速度定数である。 $[\text{rutin}]$ と $[\Gamma]$ はそれぞれ添加したルチンと Γ の濃度である。ルチン未添加状態での吸光度 Abs_0 を基準値とし、ルチン添加時の吸光度を Abs とすると、以下の式が成立する。

$$\frac{Abs}{Abs_0} = \frac{1 + ab \frac{[\text{rutin}]}{[\Gamma]}}{1 + b \frac{[\text{rutin}]}{[\Gamma]}} \quad (2-15)$$

ここで a と b はそれぞれフィッティングの際のアジャスタブルパラメータで、以下のようにそれぞれモル吸光係数と反応速度定数の比を意味している：

$$a = \frac{\varepsilon_{\text{rutin}}}{\varepsilon_{\Gamma}}, \quad b = \frac{k_{\text{rutin}}}{k_{\Gamma}}, \quad (2-16)$$

$\cdot\text{OH}$ と Γ との反応速度定数 ($k_{10} = 1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) はよく知られており、フィッティングして得られた係数 a 、 b から、ルチンと αG ルチンの反応速度定数をそれぞれ $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定した。 $\varepsilon_{\text{I}_2^-}$ は I_2^- のモル吸光係数は $2300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Muroya et al. 2017) と報告されている。これを元にすると、 $\varepsilon_{\text{Rutin}}$ と $\varepsilon_{\alpha\text{G-Rutin}}$ をそれぞれ 570 、 $670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ と概算して使用した。

2.3.4. 水和電子との反応

図 2-7 に e_{aq}^- との反応で観察された過渡吸収スペクトルを示す。パルスあたりの線量は 7.7 Gy であった。 e_{aq}^- の 720 nm の吸収ピークは、ルチンまたは αG ルチンと反応で減衰し、 $400 \sim 800 \text{ nm}$ の範囲に生成物の弱い吸収ピークが見られた。水和電子の減衰速度は、生成物の吸収も考慮した次式で計算した。

$$y = C \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + D \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right\} \quad (2-17)$$

ここで、 y は吸収度で、 ts は経過時間、 τs は e_{aq}^- の減衰の時定数、 C と D はそれぞれ e_{aq}^- と生成物の吸光係数である。減衰速度は時定数 τ の逆数であり、

ルチンまたは αG ルチンとヨウ化物アニオンの濃度比の関数として図 2-7 (b) にプロットした。ルチンやヨウ化アニオンは水和電子と比べて過剰で、反応は擬一次反応とみなせ、減衰速度は次式のように捕捉剤の濃度に比例する：

$$\frac{1}{\tau_{18}} = k_{18}[\text{rutin}] \quad (2-18)$$

ここで、 $k_{18} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ は反応速度定数である。複数濃度で得られた反応速度からフィッティングし、ルチンおよび αG ルチンと水和電子 (e_{aq}^-) の反応速度定数はそれぞれ $(1.1 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と $(1.4 \pm 0.2) \times 10^{10} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定された。フィッティングの曲線は原点を通らないが、これはスパー内での水和電子同士の再結合反応などの寄与と解釈できる。

2.4. 第二章のまとめ

本章では、天然のフラボノイドであるルチンとグリコシル基を導入した α G ルチンが水の放射線ラジカルとの反応をパルスラジオリシス法で調べた。

ルチン及び α G ルチンが水の放射線分解ラジカルや dGMP ラジカルと反応する際の速度定数を比較すると、ルチン、 α G ルチンともに大きな差異がない速度定数を示したことが分かる。このことから、ラジカルとの反応部位は主骨格（ケルセチン部位）に存在すると考えられ、配糖体の部分でないと考えられる（図 1-1 参照）。主骨格のケルセチンにはカテコール構造が存在し、その構造は \cdot OH との反応速度定数が $1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 程度と速いことが報告されている (Savel'eva et al. 1972) 。したがって、カテコール構造が主要な反応部位と示唆されている。

\cdot OH との反応（ラジカル除去）で観察された過渡吸収スペクトルには、400、440、550 nm に 3 つのピークがあった。400 nm は電子引抜反応、440 nm は水素引抜反応、550 nm は \cdot OH 付加反応の生成物にとそれぞれ対応する。

反応速度定数を決定する際に競争反応を用いた。ルチンの場合は $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 α G ルチンの場合は $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と評価された。

水和電子との反応も調べた。水和電子との反応速度定数はルチンの場合は $(1.1 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で、 α G ルチンの場合は $(1.4 \pm 0.2) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と評価された。

DNA のモノマー物質として使用した dGMP と \cdot OH の反応における過渡吸収スペクトルでは、400~700 nm に及ぶ弱くてブロードな吸収帯が見られた。低濃度のルチンまたは α G ルチンを添加すると、数十ナノ秒後に新しい吸光ピークが 440 nm に現れた。このピーク形状は、ルチンまたは α G ルチンが \cdot OH と反応して水素原子を失った際のスペクトルに似ていた。これにより、抗酸化添加で得られた新しいピークは、 \cdot OH に酸化された dGMP ラジカルが水素供給により回復されるプロセスといえる。これまでに、これほど明瞭に観測されてはいない。また、化学回復の速度定数は、ビルドアップのフィッティングよりルチンの場合は $(9 \pm 2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 α G ルチンの場合は $(6 \pm 1) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と概算された。

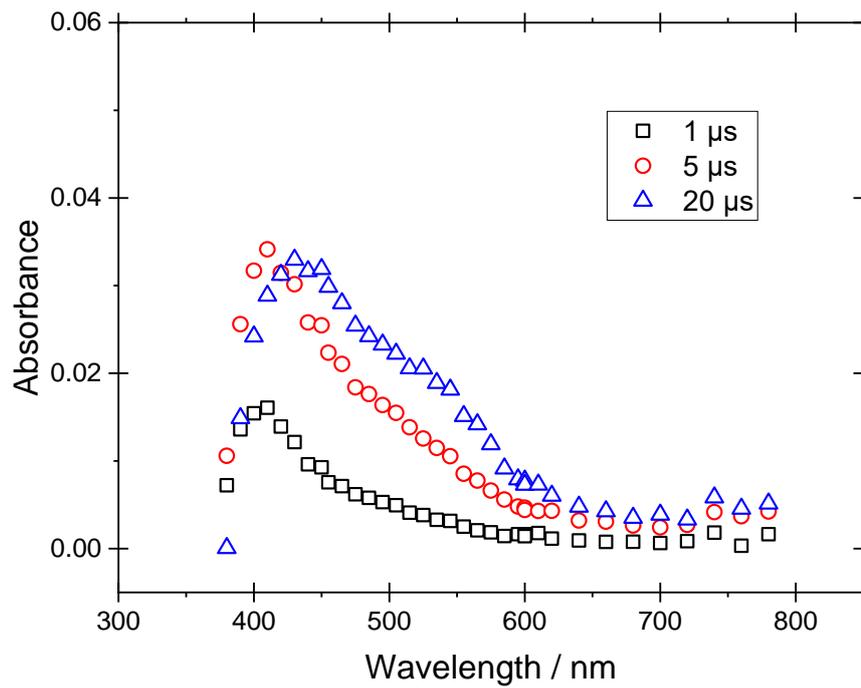
ルチンと α G ルチンでは、 \cdot OH、水和電子及び酸化された DNA 初期損傷との反応で速度定数に差が認められなかった。このことから、上記のラジカルとの反応は主骨格で起こっていることが示唆された。

放射線にさらされる前にフラボノイドなどの少量の放射線防護剤を摂取すると、健康な細胞が化学回復によって保護され、効果的であると期待される。化学回復は放射線の間接作用だけでなく、直接作用に対しても有効であると考えられる。

酸化された dAMP (2'-deoxyadenosine-5-monophosphate) の電子移動(Li et al. 2000)や水和電子との反応した後に AMP (adenine 5-monophosphate) の電子移動 (Visscher et al. 1988)などが報告されている。理論上では、塩基損傷はグアニン以外の塩基でも検出できる。

塩基損傷だけでなく、鎖切断での知見も重要である。例えば C4 部位は糖鎖上で最も反応しやすいサイト(Pogozelski et al. 1998)で、水素引き抜き反応は主に 5 位に形成し、いずれも最終的には鎖切断を誘導することが知られている(Douki et al. 2008)。これまで、合成したらせん状のオリゴヌクレオチドでは、グアニン上で電子移動による酸化反応で生じた中間体をパルスラジオリシス法より検討した事例が報告されている(Kobayashi et al. 2003)。電子を失った塩基は、ホール移動によりもっとも酸化されやすいグアニン上から電子を奪う反応を引き起こす。その後、プロトン脱離でグアニンが中性ラジカル化し、DNA 損傷が安定な変異として固定される。鎖状 DNA でもヌクレオチド単量体と同じ傾向が示されるから、高分子としての DNA に対しても抗酸化剤の防護機能が効果的であると考えられる。鎖状 DNA で知見が得られれば、生体内での抗酸化剤の防護メカニズム解明にもつながると期待できる。

(a)



(b)

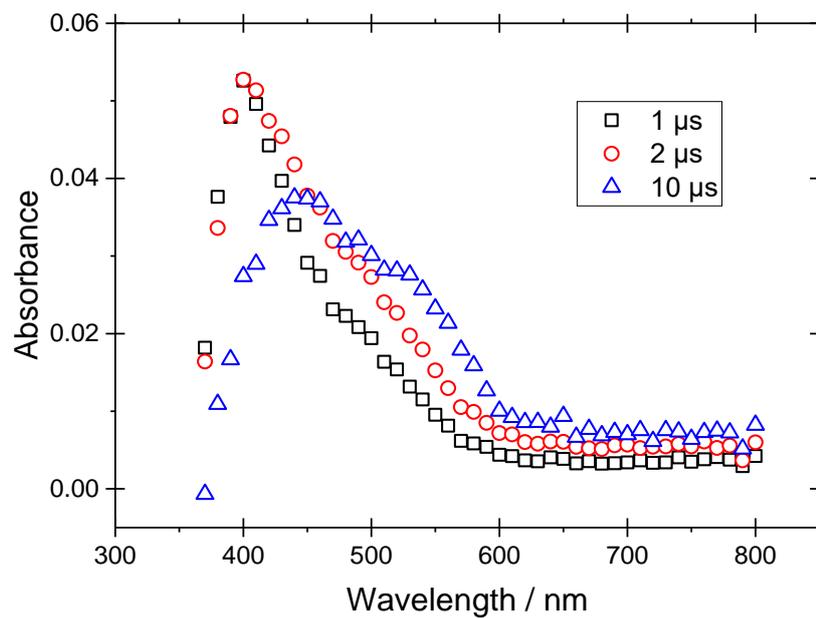
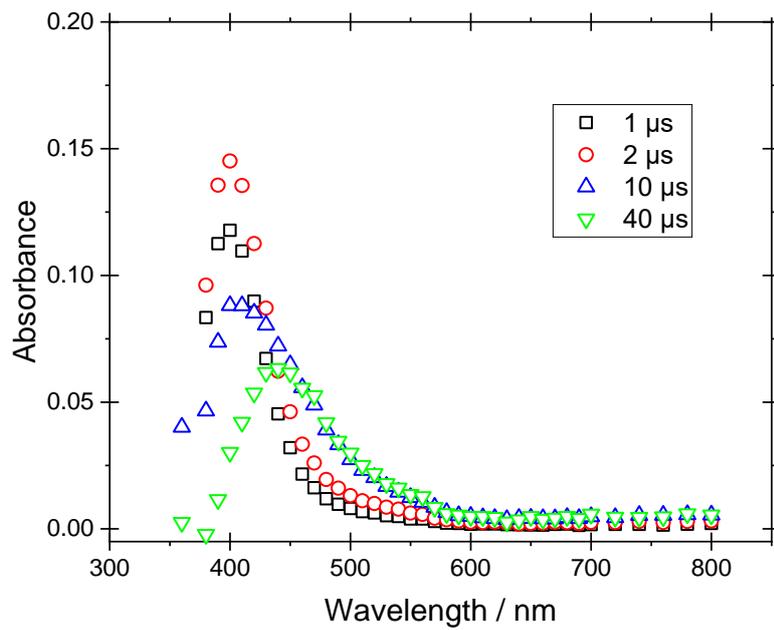


図 2-1 $\cdot\text{OH}$ との反応に観察された過渡吸収スペクトル (a) 20 μM ルチン (b) 100 μM αG ルチン

(a)



(b)

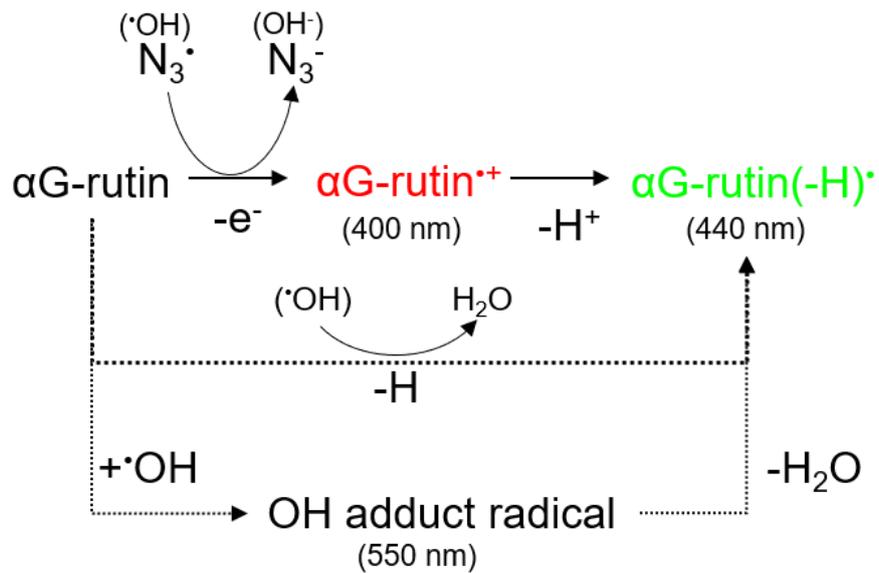


図 2-2 100 μ M α G ルチンと N_3^{\cdot} の反応 (a) 観察された過渡吸収スペクトル
(b) 同定された反応経路

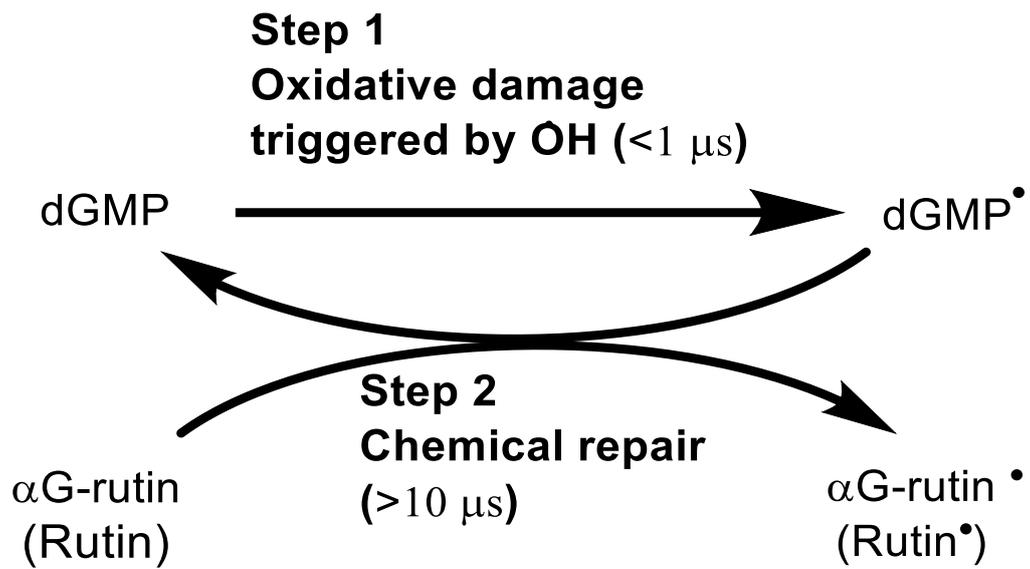
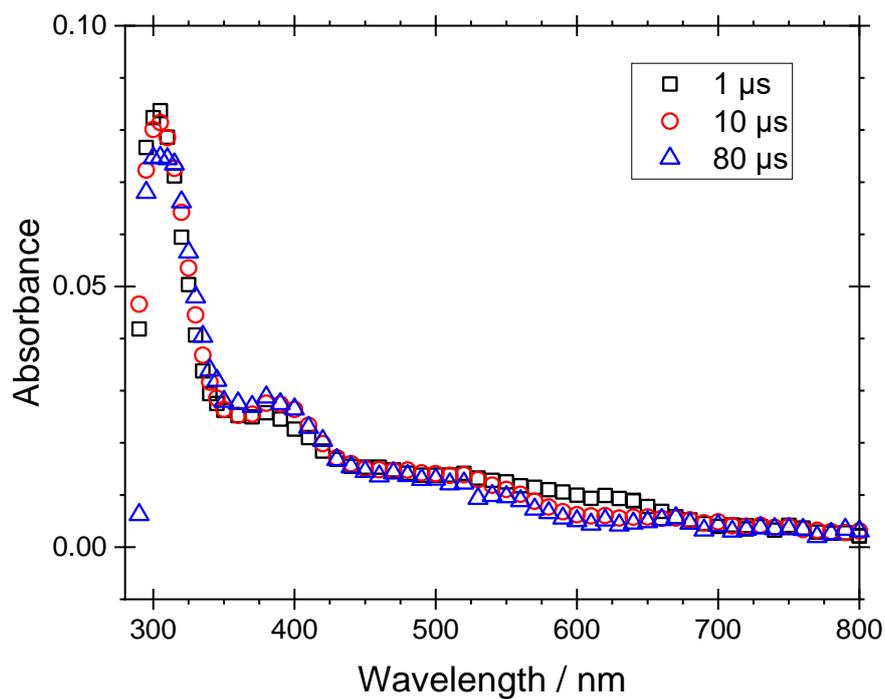


図 2-3 化学回復を観測するために設計した反応スキーム

(a)



(b)

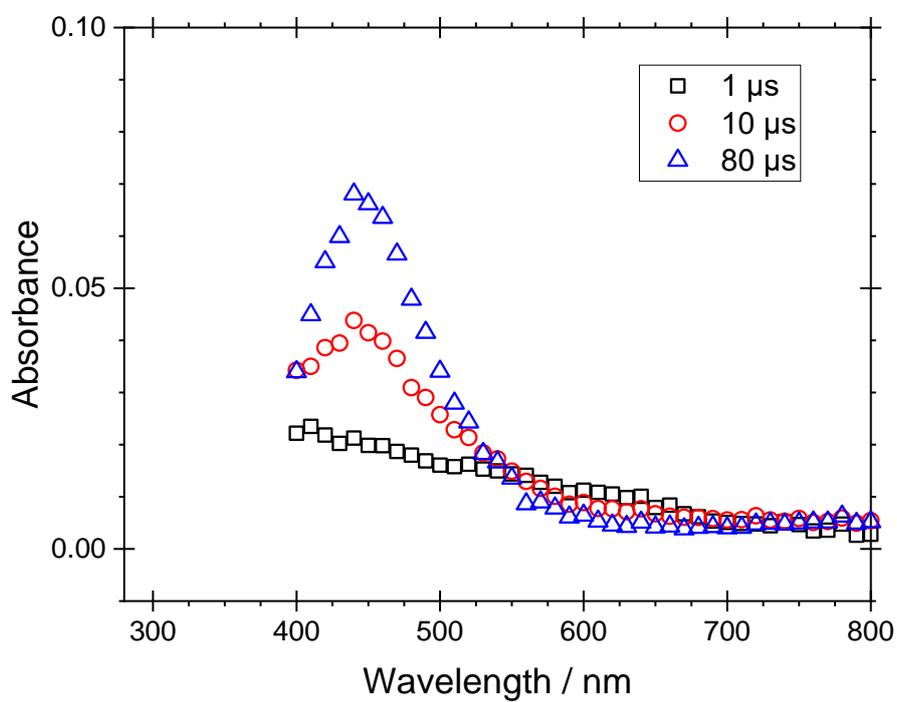


図 2-4 N_2O 飽和した水溶液中での 1.5 mM dGMP と $\cdot\text{OH}$ の反応の際に観察された過渡吸収スペクトル (a) αG ルチン非添加、(b) 100 μM αG ルチン添加時

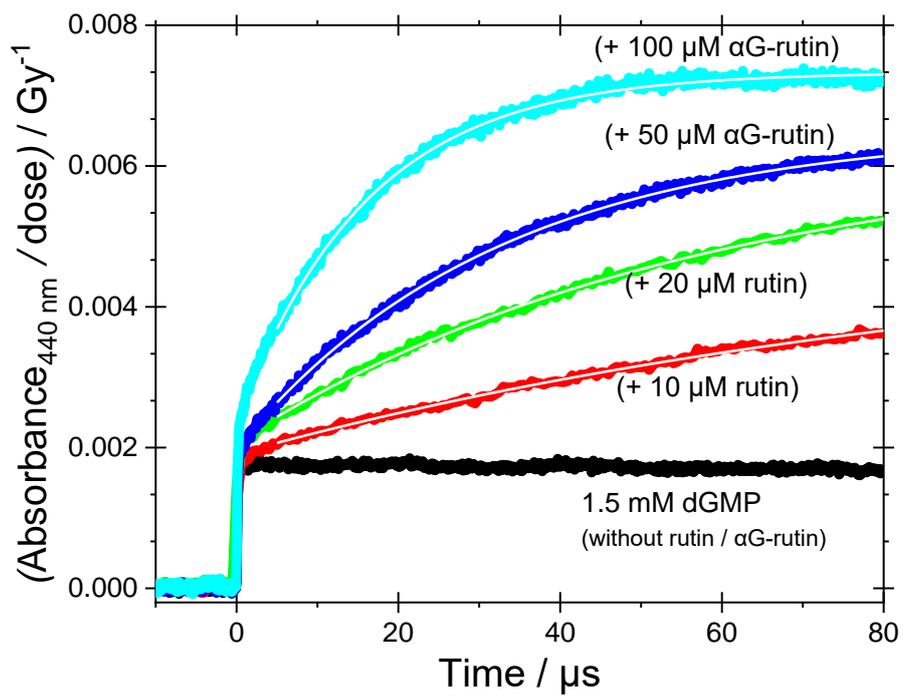
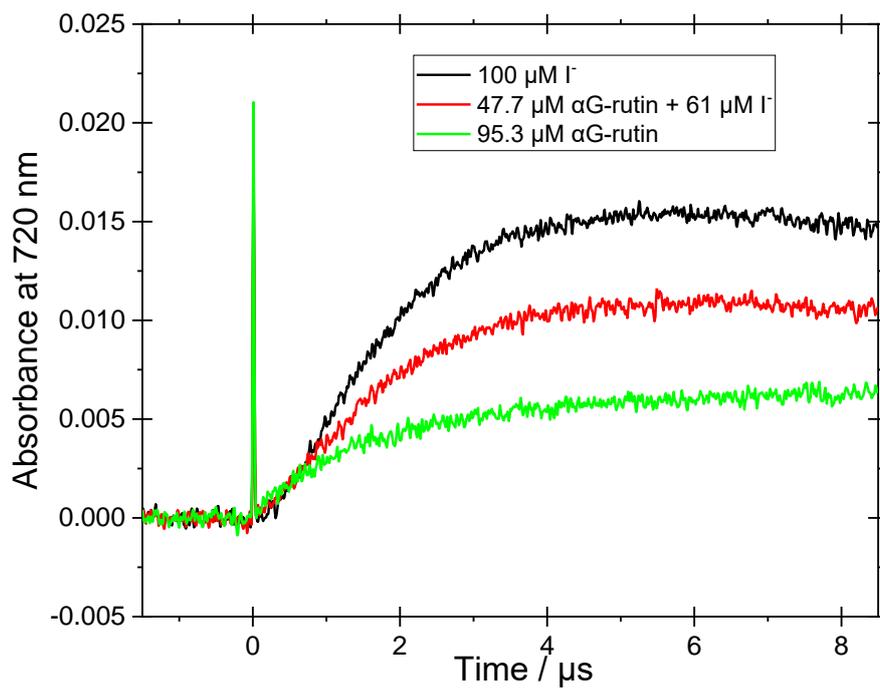


図 2-5 ルチンまたは α G ルチンの濃度に依存した 440 nm における吸光度の時間プロファイル

(a)



(b)

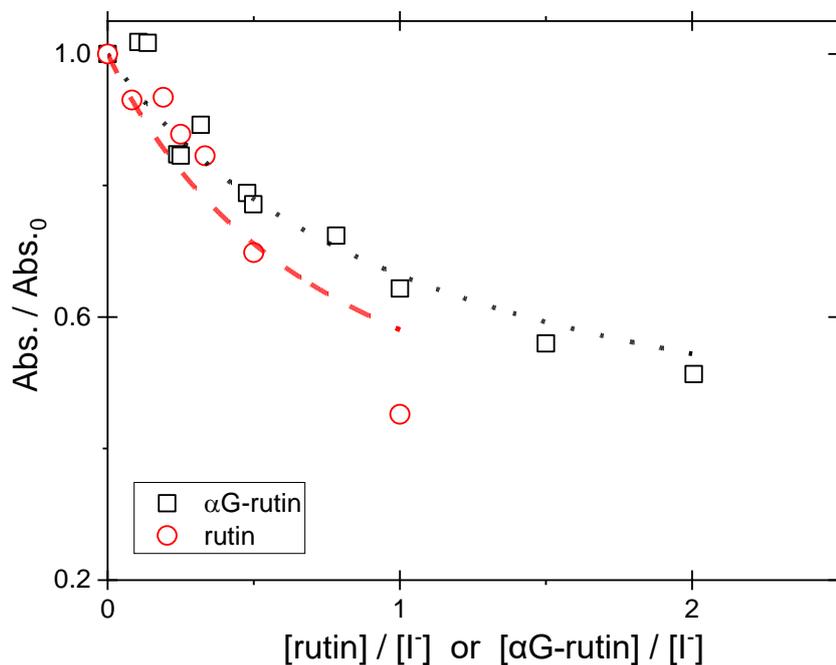
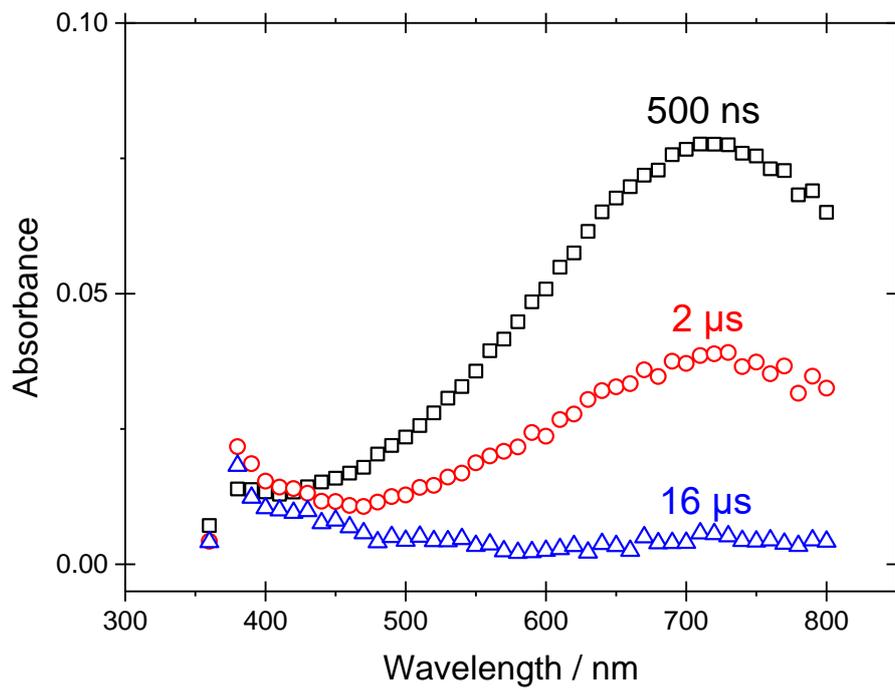


図 2-6 (a) αG ルチンと $\cdot\text{OH}$ との反応速度定数を決定するための競争反応で観察された 740 nm における時間プロファイル (b) 速度定数の決定のために用いたプロット (○ : ルチン、□ : αG ルチン)

(a)



(b)

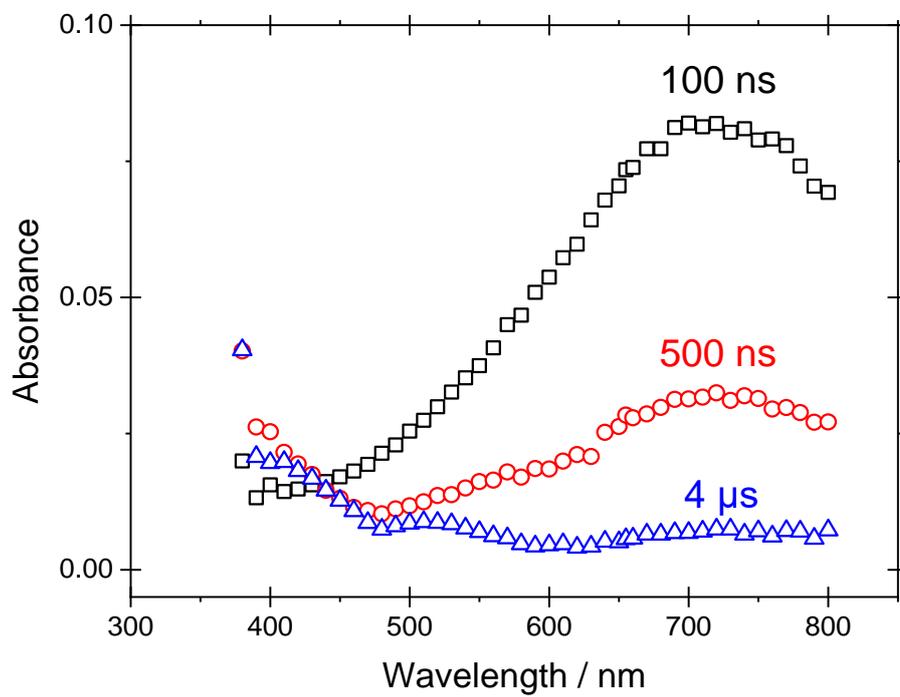
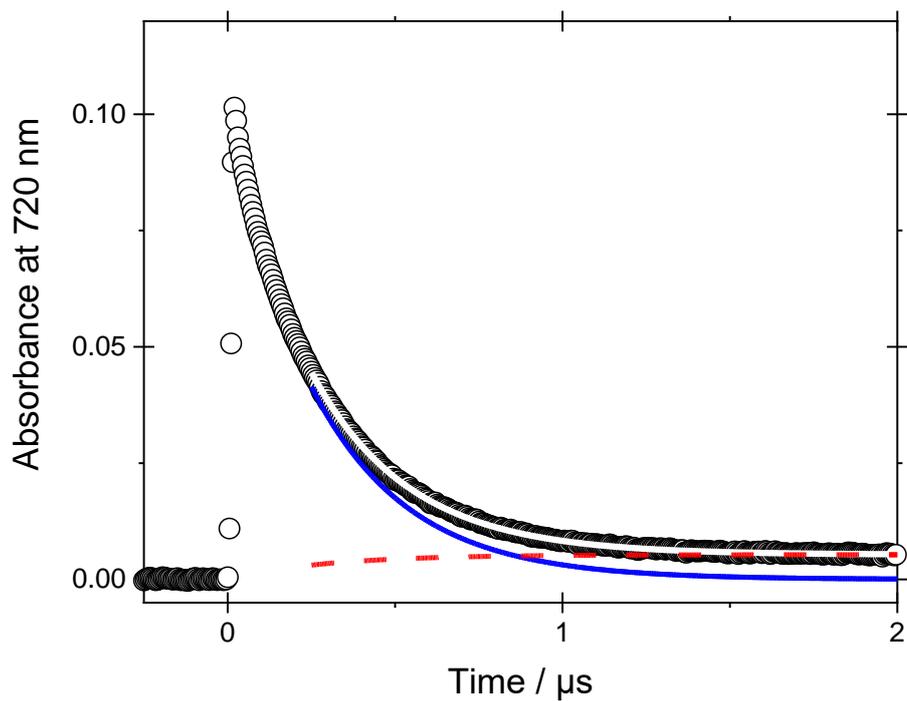


図 2-7 e_{aq}^- との反応で観察された過渡吸収スペクトル (a) 20 μM ルチン (b) 100 μM αG ルチン

(a)



(b)

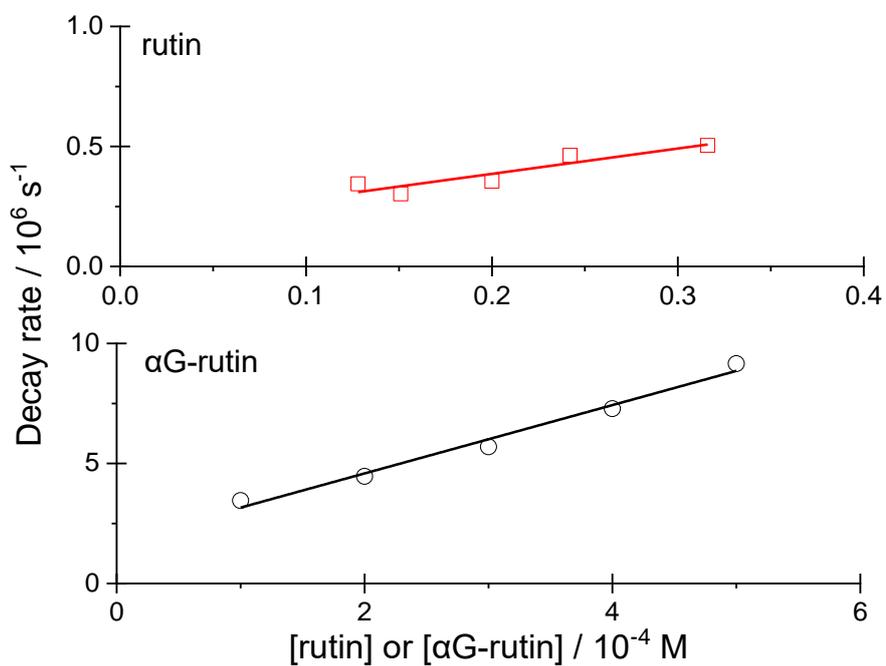


図 2-8 (a) $100 \mu\text{M}$ αG ルチンと e_{aq}^- の反応の際に 720 nm で観察された時間プロファイル。白線は、点線で示した e_{aq}^- の減衰と生成物の生成の和になっている。(b) 反応速度定数の決定に用いたプロット

第3章 放射線由来の DNA 変異を高感度に検出する手法の確立

(要約)

細胞などの体内環境では様々な要素が影響されるため、短時間領域の放射線防護基礎過程だけが細胞内で機能しているとは限らない。より体内に近い環境での抗酸化剤の防護基礎過程の知見が必要となる。

そこで DNA の安定変異に着目し、抗酸化剤の微量添加による放射線防護効果を検討した。大腸菌から抽出したらせん状プラスミド DNA で、鎖切断及び塩基損傷を検出することで抗酸化剤の作用を評価した。一般的に DNA は保存のため酸化ストレスを低減できる捕捉剤が保存液に用いられている。本章では微量の抗酸化剤添加の効果を調べるための手法確立と改良を実施した。また、抗酸化剤未添加状態で放射線由来の損傷も検討してみた。

本章では以下の内容を行った。

- (1) 不純物除去による DNA 試料の高純度化
- (2) 高純度 DNA 試料に対する放射線直接作用と間接作用の検出手法の改良
- (3) DNA 試料に対する放射線の線質効果と希釈効果の検討

3.1. 安定な DNA 損傷の検出法と本章の目的

放射線は生物の遺伝情報に損傷を与え、一般的には変異原性または遺伝毒性などの実験でその影響が調べられる。DNA 損傷の検出は、細胞内で行う場合と DNA 分子そのもので行う場合に大別される。細胞内では、細胞の形態学的の変化を伴い、細胞分裂での細胞の形態的な変化を顕微鏡で観察することが多い。例えば、DNA 損傷を受けた細胞がアポトーシスにより細胞死を導く場合、放射線の照射による細胞の生存率を検討するほかに、細胞分裂中に染色体異常から生じた小核を観察する小核実験なども行われる。一方、DNA 分子での検出では、DNA 高分子を細胞内から抽出し、細胞分裂に伴わない DNA の放射線による損傷を検出する。例えば、DNA 断片の形態を分離する電気泳動法や、蛍光物質を用いて DNA を可視化させて顕微鏡で目視するコメットアッセイ法などがある。細胞内では細胞修復が行われるため、抗酸化剤の微量添加による初期 DNA 損傷への影響はわかりにくくなる。そのため、一般的にアガロースゲル電気泳動法などで DNA 損傷を検出することが多い。DNA とタンパク質は分子の質量または電荷量が異なるため、電界を印加すると DNA は分子量や電荷量に応じてアガロース上を移動スピードが異なる。この特徴を利用して DNA 損傷を分離して検出する手法がアガロースゲル電気泳動法である。アガロース電気

泳動法はランニングコストが低く、分子の移動度から簡便に DNA 状態の可視化ができるため、DNA 損傷や細胞内のタンパク質を検出する目的で広く使われる。

人のゲノムは 23 組の染色体から構成され、染色体ごとに約 6×10^9 の塩基対 (base pairs, bps) がある。塩基対が多く質量も大きいため、アガロースゲル電気泳動法では分離されにくい。このため、モデル化 DNA 分子として、数 kbps 程度の塩基対の DNA 断片を用いることが多い。一般的には、遺伝子工学では特定の DNA 塩基配列の影響を調べるためにクローニングベクター (Cloning vector) を使う。クローニングベクターとは、特定の遺伝情報を含む DNA の塩基配列を調べるために、人工的に遺伝子組み換えした DNA 塩基配列を持つ数 kbps 程度の DNA 断片のことである (Rodriguez et al. 1989, Lodish et al. 2000)。遺伝子組み換え DNA の中で最も使用されるのはプラスミド DNA で、大腸菌の体内では複製することができる。例えば pUC18/19 (2686 bp)、pBR322 (4361 bp) などは通常の大腸菌のプラスミド DNA よりはるかに短く、すでに全配列が明らかとなっている。遺伝子組み換え時の操作に備えてアンピシリンをはじめとした薬剤耐性遺伝子が含まれ、また細胞 (大腸菌) 分裂時の複製の正確性を維持する耐熱性の遺伝子が含まれるという特徴から、本研究では DNA として pUC18 を利用した。

Milligan らは pUC18/pBR322 への γ 線照射を行った (Milligan et al. 1993)。 $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤である DMSO の添加による $\cdot\text{OH}$ 収率の違いをもとに、SSB 及び DSB の収率を算出している。同じ研究グループの Leloup らは、陽子線やヘリウム線が生じるクラスター損傷 (局所的に大量に生成された損傷、10 nm 程度に複数個の DNA 損傷が生じたもの) の生成収率を報告している (Leloup et al. 2005)。Yokoya らは TE (Tris-EDTA) 緩衝液に保存したプラスミド DNA を用いて、 γ 線照射での直接作用を報告している (Yokoya et al. 2002) ほか、クラスター損傷の難修復性についても検討している。同じ研究グループの Urushibara らはプラスミド DNA を用いて線質効果について検討している (Urushibara et al. 2006)。

これまでの研究では、放射線の作用を調べているものの、DNA は保管のために $\cdot\text{OH}$ 捕捉機能を有する TE 緩衝液に保管されることが多く、抗酸化剤の微量添加効果を検討することが困難であった。また、抽出過程で DNA 溶液中に混入した不純物の影響も懸念される。本章では DNA 試料に不純物を除去する手段を検討し、確立した。また、過去の報告との比較から、TE 緩衝液の溶質の放射線防護効果についても検討してみた。

3.2. 第三章のまとめ

本章では高感度に放射線作用を検出する手法の改良を実施した。

まず、透析工程より溶媒内の不純物を除去し、不純物の存在による影響を調べた。二日間の透析は DNA の放射線感受性を大幅に向上させ、一週間の透析を続けると DNA の放射線感受性が安定した。このことから、一週間の透析で有機分子などの不純物を取り除くことができ、放射線作用に対する高感度の DNA 試料を獲得できたと考えられる。

次に、高純度 DNA 試料を用いて、放射線の間接作用と直接作用由来の安定変異を検出してみた。DNA 希薄水溶液で放射線の間接作用を、フィルム状 DNA で放射線の直接作用をそれぞれ評価した。損傷を受けた DNA 試料を電気泳動法より分離し、DNA 損傷の収率から放射線由来の安定変異の特徴を検討した。

間接作用由来の DNA 損傷は、主に DNA 濃度と溶媒の種類に影響される。

(1) DNA の濃度変化は、鎖切断と塩基損傷の収率の比率変化をさせる。希釈効果により濃度の薄い DNA はいずれの損傷の収率も減少したが、重度な DSB の生成頻度がより低減した。(2) $\cdot\text{OH}$ と反応性の高い溶媒は DNA の放射線感受性を低減させ、放射線への防護効果を示した。以上のことから、抗酸化剤の微量添加による影響を調べるには、 $\cdot\text{OH}$ と反応性の高い溶媒の除去や濃度の安定維持が必要であることが分かった。

直接作用ではエネルギーを直接 DNA に付与するため、DNA 付近の水分子数を極力減らしたフィルム状 DNA で検出した。(1) 水分子数の高い希薄水溶液と比べて、フィルム状 DNA のいずれの損傷も収率が低くなった。(2) 損傷のうち重度な鎖切断、特に DSB 損傷の生成比率が高くなった。これは、低水和水状態の試料に、放射線のエネルギーが第一水和層に集中させられると考えられる。

放射線の線質効果を調べるために重粒子線での実験も実施した。(1) 希薄水溶液での DNA 損傷は間接作用由来のものが支配的であり、損傷の収率の LET 依存性は $\cdot\text{OH}$ 収率の LET 依存性と高い相関があった。(2) 放射線直接作用に由来の DNA 損傷は、LET 増加に伴って鎖切断の収率が低くなったが、重度な DSB 損傷の生成比率が高くなった。これは、DSB 損傷の生成は重粒子線の飛跡やエネルギー付与に伴う空間構造の変化に依存していると考えられる。

第4章 安定な DNA 損傷の生成頻度から ルチンの防護効果への評価

(要約)

高純度プラスミド DNA を用いて、放射線の直接作用と間接作用由来の DNA 損傷を検出した。抗酸化剤の微量添加による DNA 損傷収率の変化から、抗酸化剤の放射線基礎過程であるラジカル捕捉と化学回復を評価した。

4.1. 抗酸化剤添加の防護効果と本章の目的

DNA 試料を用いた抗酸化剤の防護効果に関する研究はいくつかあった。Anderson らはカテキン類の放射線防護効果が、電子移動（または水素移動）と強い相関性があり、 $\cdot\text{OH}$ 由来の酸化性損傷のおよそ 40% が化学回復によって修復されたと報告されている(Anderson et al. 2001)。Hata らはアスコルビン酸の放射線防護効果を競争反応より計算し、放射線防護効果のうち化学回復が示す割合は 50-63% 程度と報告されている(Hata et al. 2013)。また、SSB 損傷の前駆体である電子ホール(Jovanovic et al. 1989)や、二つの SSB から生じる DSB(Prise et al. 1993)に対しても、抗酸化剤が化学回復といった防護効果があると報告されている。

本章では、高純度化した DNA 試料を用いて、抗酸化剤の微量添加による防護効果、特に化学回復の検出と評価をすることに目的とした。

4.2. 第四章のまとめ

本章では改良した DNA 損傷の高感度検出手法を用いて、抗酸化剤の微量添加による DNA 収率の変化を調べた。代表的な抗酸化剤であるアスコルビン酸と α G ルチンを用いて、X 線を照射したプラスミド DNA の鎖切断及び塩基損傷に対する防護効果を検討した。

放射線の間接作用または直接作用に対して、抗酸化剤の微量添加は DNA の損傷収率が低下したことが明らかとなった。

DNA 希薄水溶液で放射線間接作用に由来する DNA 損傷への防護効果を調べた α G ルチンとアスコルビン酸の添加により DNA 損傷の収率が低減したが、鎖切断と塩基損傷の比率変化から、アスコルビン酸の場合では塩基損傷を α G ルチンの場合は鎖切断を優先的に防護または回復する傾向が見られた。これは、抗酸化剤の分子構造の違いが DNA 損傷生成の低減に影響していることを示唆している。

フィルム状 DNA で放射線直接作用に由来する DNA 損傷への防護効果を調べた。DNA に添加した抗酸化剤ルチンは低濃度であっても、フィルム状 DNA を作製する過程での濃縮によって比較的高濃度の抗酸化剤となった。誤差は非常に大きかったが、鎖切断と塩基損傷の収率はルチンの添加により低減したことが分かった。また鎖切断に比べて、塩基損傷の収率の低減率が高かったことが明らかにした。フィルム状 DNA は直接作用由来の損傷が支配的であり、DNA 損傷の低減は、抗酸化剤の化学回復によるものだと考えられる。塩基損傷の低減率は鎖切断と比べて高いため、塩基損傷は比較的化学回復されやすいことも示唆されている。

第5章 結論と今後の展望

5.1. 結論

放射線ガン治療を高度化させるための添加薬剤のメカニズム解明を背景とし、本研究は抗酸化剤ルチンの放射線防護基礎過程に着目して、放射線由来の損傷に対する防護プロセスの解明を試みた。抗酸化剤ルチン及び人工合成した α Gルチンを用いて、放射線防護基礎過程であるラジカル捕捉及び化学回復の観測と評価を実施した。

短時間領域におけるルチンのラジカル捕捉と化学回復をパルスラジオリシス法により直接観測した。水の放射線分解ラジカルとの反応でルチンのラジカル捕捉を、酸化されたDNA分子に対する電子（水素）授受反応で化学回復を観測することに成功した。化学回復は酸化還元反応によって、特異的にDNA初期損傷を選択的に修復する重要なプロセスであり、これまでのない明瞭な観測結果を得られた。

体内環境を模擬するため、安定なDNA損傷の検出を実施した。まず、DNA損傷の検出手法の改良を行い、透析による高感度にDNA損傷を検出できる手法を改良して確立した。放射線の直接と間接作用由来のDNA損傷を評価し、線質効果など放射線作用によるDNA損傷への影響要因を見出した。

ルチンの微量添加によるDNA損傷の収率変化を調べた。放射線直接と間接作用に対して、ルチンはDNA損傷に対する防護効果を示した。ルチンが間接作用ではラジカル捕捉と化学回復の存在を、直接作用では化学回復の存在を検出できた。これまでに、直接作用に対する化学回復の検出はほとんどなく、従来の理論を実験的な知見より拡張させた。また、抗酸化剤の分子構造によるDNA損傷への防護経路が異なることも明らかにした。

5.2. 今後の展望

本研究で得られた知見は、抗酸化剤の防護基礎過程を解明することだけでなく、新薬開発に波及する効果が期待できる。その際、今後必要となる検討項目について以下に記す。

● 重粒子線への展開

本研究では、重粒子線における抗酸化剤の微量添加実験は間接作用にとどまった。フィルム状 DNA を用いて直接作用による損傷を検出することで、抗酸化剤の防護効果が異なる放射線線質である高 LET 放射線でも機能するかどうか、検討することが重要である。間接作用由来の DNA 損傷は主に $\cdot\text{OH}$ の収率に依存しているため、 $\cdot\text{OH}$ 収率の線質依存性といった量的な対応しか検討できない。直接作用由来の DNA 損傷は放射線線質の質的な違い、つまり損傷のタイプや密度が異なると予想される。本研究では、すでに直接作用由来の損傷に対する放射線の防護効果（化学回復）が機能していることが示したが、複雑なクラスター損傷に対しても防護効果が機能しているのか、またどの程度に機能しているのか、検討していく必要がある。この知見は重粒子線放射線ガン治療での薬剤開発に大きな価値があると期待できる。

● 添加濃度によるルチンの防護効果の変化

抗酸化剤を適切以上の濃度に添加すると、細胞膜と反応するなど細胞のアポトーシスを誘導する可能性がある。ルチンを含めたフラボノイド全体では防護効果だけでなく、種類と濃度によっては放射線に対する増感効果があると報告されている(Hardigree et al. 1978)。例えば、フラボノイドがスーパーオキシドアニオンと反応して過酸化水素を生成し、Fe/EDTA 複合体の存在する体系では Fenton 反応により鉄イオンが過酸化水素と反応して $\cdot\text{OH}$ が発生することで、フラボノイドは酸化の促進作用を示すことが報告されている(Kessler et al. 2003)。フラボノイドは酸化を防止する機能以外に、酸化を促進昨日も留意する必要がある。

● 細胞内への送達性問題

天然フラボノイドであるルチンは、水溶性は 12 g/L 程度(Krewson et al. 1952)と実用には向かない。グルコシル基を添加することでその親水性を飛躍的に向上させることができるが、分子は従来よりも大きくなった。分子構造や親水疎水性によるが、分子量を 300 を超えた物質は細胞膜を透過しにくい。 αG ルチ

ンの場合は分子量が 700 を超えるため、細胞膜への透過率が低いと予想される。優れた放射線防護機能を持っているにもかかわらず、核酸の付近に到達しない限り放射線を防護する役割を果たすことは困難である。これまでに、複数種類のフラボノイドの複合体を作成し、細胞膜への透過率を上げる方法が報告されている(Aizawa et al. 2018)が、必ずしも効果的であったとは言い難い。近年では膜透過性のペプチドを用いて細胞内に分子送達する方法が報告されており(Nakase et al. 2008)、実用化に向けて検討していく必要がある。放射線防護機能を有する構造が体内で生合成する可能性や、人工的に製薬する手段が確立できれば、抗酸化剤の放射線防護が実用に向けて大きな進展があると期待できる。

参考文献

- Agarwal, O. P. and A. Nagaratnam (1981). "Radioprotective property of flavonoids in mice." Toxicol **19**(2): 201-204.
- Aizawa, Y., S. Sunada, H. Hirakawa, A. Fujimori, T. A. Kato and M. Uesaka (2018). "Design and evaluation of a novel flavonoid-based radioprotective agent utilizing monoglucosyl rutin." J Radiat Res **59**(3): 272-281.
- Anderson, R. F., C. Amarasinghe, L. J. Fisher, W. B. Mak and J. E. Packer (2000). "Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids." Free Radical Research **33**(1): 91-103.
- Anderson, R. F., L. J. Fisher, Y. Hara, T. Harris, W. B. Mak, L. D. Melton and J. E. Packer (2001). "Green tea catechins partially protect DNA from $\cdot\text{OH}$ radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals." Carcinogenesis **22**(8): 1189-1193.
- Boiteux, S., E. Gajewski, J. Laval and M. Dizdaroglu (1992). "Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization." Biochemistry **31**(1): 106-110.
- Burns, M. (1987). Low-Level Radioactive Waste Regulation-Science, Politics and Fear, CRC Press.
- Buxton, G. V., C. L. Greenstock, W. P. Helman and A. B. Ross (1988). "Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\text{OH}^{\cdot}/\text{O}^{\cdot-}$ in Aqueous Solution." Journal of Physical and Chemical Reference Data **17**(2): 513-886.
- Buxton, G. V. and C. R. Stuart (1995). "Re-evaluation of the thiocyanate dosimeter for pulse radiolysis." Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions **91**(2): 279-281.
- deLara, C. M., T. J. Jenner, K. S. Townsend, S. J. Marsden and P. O'Neill (1995). "The effect of dimethyl sulfoxide on the induction of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells by alpha particles." Radiation research **144**(1): 43-49.
- Dizdaroglu, M., J. Laval and S. Boiteux (1993). "Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals." Biochemistry **32**(45): 12105-12111.
- Douki, T. and J. Cadet (2008). "Radiation-induced damage to DNA: from model compounds to cell." Radiation Chemistry: From Basics to Applications in Material and Life Sciences. Paris, EDP Sciences.
- Ebert, M. (1965). Pulse radiolysis: proceedings, Academic Press.
- Elliot, A. J. (1992). "A pulse radiolysis study of the reaction of OH with I_2 and the decay of $\text{I}_2^{\cdot-}$." Canadian Journal of Chemistry **70**(6): 1658-1661.

- Fu, H., Y. Katsumura, M. Lin, K. Hata, Y. Muroya and Y. Hatano (2008). "Fast repair activities towards dGMP hydroxyl radical adducts by silybin and its analogues." Journal of Radiation Research **49**(6): 609-614.
- Fu, H., M. Lin, Y. Katsumura, A. Yokoya, K. Hata, Y. Muroya, K. Fujii and N. Shikazono (2010). "Protective effects of silybin and analogues against X-ray radiation-induced damage." Acta Biochim Biophys Sin **42**(7): 489-495.
- Fu, H., M. Lin, Y. Muroya, K. Hata, Y. Katsumura, A. Yokoya, N. Shikazono and Y. Hatano (2009). "Free radical scavenging reactions and antioxidant activities of silybin: mechanistic aspects and pulse radiolytic studies." Free Radical Research **43**(9): 887-897.
- Fulford, J. (2000). Quantification of complex DNA damage by ionising radiation: an experimental and theoretical approach.
- Gomez-Mendoza, M., A. Banyasz, T. Douki, D. Markovitsi and J.-L. Ravanat (2016). "Direct oxidative damage of naked DNA generated upon absorption of UV radiation by nucleobases." The journal of physical chemistry letters **7**(19): 3945-3948.
- Griffith Jr, J., E. Anthony, E. Pendergrass and R. Perryman (1947). "Effect of rutin on recovery time from radiation injury in rats." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **64**(3): 332-333.
- Gulston, M., J. Fulford, T. Jenner, C. de Lara and P. O'Neill (2002). "Clustered DNA damage induced by γ radiation in human fibroblasts (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA is revealed as Fpg and Nth sensitive sites." Nucleic acids research **30**(15): 3464-3472.
- Hall, E. J. and A. J. Giaccia (2006). Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
- Hardigree, A. and J. Epler (1978). "Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems." Mutation Research/Genetic Toxicology **58**(2-3): 231-239.
- Hart, E. J. and J. Boag (1962). "Absorption spectrum of the hydrated electron in water and in aqueous solutions." Journal of the American Chemical Society **84**(21): 4090-4095.
- Hata, K., M. Lin, Y. Katsumura, Y. Muroya, H. Fu, S. Yamashita and H. Nakagawa (2011). "Pulse radiolysis study on free radical scavenger edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one). 2: A comparative study on edaravone derivatives." Journal of Radiation Research **52**(1): 15-23.
- Hata, K., A. Urushibara, S. Yamashita, M. Lin, Y. Muroya, N. Shikazono, A. Yokoya, H. Fu and Y. Katsumura (2015). "Chemical repair activity of free radical scavenger edaravone: reduction reactions with dGMP hydroxyl radical adducts and suppression of base lesions and AP sites on irradiated plasmid DNA." Journal of Radiation Research **56**(1): 59-66.

- Hata, K., A. Urushibara, S. Yamashita, N. Shikazono, A. Yokoya and Y. Katsumura (2013). "Chemical repair of base lesions, AP-sites, and strand breaks on plasmid DNA in dilute aqueous solution by ascorbic acid." Biochem Biophys Res Commun **434**(2): 341-345.
- Hata, K., A. Urushibara, S. Yamashita, N. Shikazono, A. Yokoya and Y. Katsumura (2013). "Chemical repair of base lesions, AP-sites, and strand breaks on plasmid DNA in dilute aqueous solution by ascorbic acid." Biochemical and biophysical research communications **434**(2): 341-345.
- Hicks, M. and J. M. Gebicki (1986). "Rate constants for reaction of hydroxyl radicals with Tris, Tricine and Hepes buffers." FEBS letters **199**(1): 92-94.
- Hodgkins, P. S., M. P. Fairman and P. O'Neill (1996). "Rejoining of gamma-radiation-induced single-strand breaks in plasmid DNA by human cell extracts: dependence on the concentration of the hydroxyl radical scavenger, Tris." Radiation research **145**(1): 24-30.
- Hori, M., T. Matsuda, A. Shibata, K. Katanoda, T. Sobue and H. Nishimoto (2015). "Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project." Japanese journal of clinical oncology **45**(9): 884-891.
- Jovanovic, S. V. and M. G. Simic (1989). "The DNA guanyl radical: kinetics and mechanisms of generation and repair." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1008**(1): 39-44.
- Kai, T., A. Yokoya, M. Ukai, K. Fujii, T. Toigawa and R. Watanabe (2018). "A significant role of non-thermal equilibrated electrons in the formation of deleterious complex DNA damage." Physical Chemistry Chemical Physics **20**(4): 2838-2844.
- Kessler, M., G. Ubeaud and L. Jung (2003). "Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives." Journal of pharmacy and pharmacology **55**(1): 131-142.
- Kläning, U. K. and T. Wolff (1985). "Laser Flash Photolysis of HClO, ClO⁻, HBrO, and BrO⁻ in Aqueous Solution. Reactions of Cl- and Br- Atoms." Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie **89**(3): 243-245.
- Kligerman, M. M., D. J. Glover, A. T. Turrisi, A. L. Norfleet, J. M. Yuhas, L. R. Coia, C. Simone, J. H. Glick and R. L. Goodman (1984). "Toxicity of WR-2721 administered in single and multiple doses." International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics **10**(9): 1773-1776.
- Kobayashi, K. (2017). "10 Radiation-Induced Damage in DNA." Radioisotopes **66**(10): 479-487.
- Kobayashi, K. and S. Tagawa (2003). "Direct observation of guanine radical cation deprotonation in duplex DNA using pulse radiolysis." Journal of the American Chemical Society **125**(34): 10213-10218.
- Kouvaris, J. R., V. E. Kouloulis and L. J. Vlahos (2007). "Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector." The oncologist **12**(6): 738-747.

- Kow, Y. W. and S. S. Wallace (1987). "Mechanism of action of Escherichia coli endonuclease III." Biochemistry **26**(25): 8200-8206.
- Krewson, C. and J. Naghski (1952). "Some physical properties of rutin." Journal of the American Pharmaceutical Association **41**(11): 582-587.
- Kuipers, G. K. and M. V. M. Lafleur (1998). "Characterization of DNA damage induced by gamma-radiation-derived water radicals, using DNA repair enzymes." International journal of radiation biology **74**(4): 511-519.
- Kumar, S. S., R. Chaubey, T. Devasagayam, K. Priyadarsini and P. Chauhan (1999). "Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism (s) of action." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **425**(1): 71-79.
- Latimer, W. M. (1952). Oxidation potentials, LWW.
- Leloup, C., G. Garty, G. Assaf, A. Cristovão, A. Breskin, R. Chechik, S. Shchemelinin, T. Paz-Elizur, Z. Livneh, R. W. Schulte, V. Bashkirov, J. R. Milligan and B. Grosswendt (2005). "Evaluation of lesion clustering in irradiated plasmid DNA." International Journal of Radiation Biology **81**(1): 41-54.
- Li, Y.-M., Z.-H. Han, S.-H. Jiang, Y. Jiang, S.-D. Yao and D.-Y. Zhu (2000). "Fast repairing of oxidized OH radical adducts of dAMP and dGMP by phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hemsl." Acta Pharmacologica Sinica **21**(12): 1125-1128.
- Lloyd, D. (1998). Radiation protection and the human radiation experiments, IOP Publishing.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell (2000). "Molecular cell biology 4th edition." National Center for Biotechnology Information, Bookshelf.
- Ma, J., A. Kumar, Y. Muroya, S. Yamashita, T. Sakurai, S. A. Denisov, M. D. Sevilla, A. Adhikary, S. Seki and M. Mostafavi (2019). "Observation of dissociative quasi-free electron attachment to nucleoside via excited anion radical in solution." Nature communications **10**(1): 102.
- Maruthamuthu, P. and P. Neta (1978). "Phosphate radicals. Spectra, acid-base equilibria, and reactions with inorganic compounds." The Journal of Physical Chemistry **82**(6): 710-713.
- Matsuda, T., W. Ajiki, T. Marugame, A. Ioka, H. Tsukuma and T. Sobue (2011). "Monitoring of Cancer Incidence in Japan-Survival 2003–2005 Report (Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, 2013) Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: a chronological and international comparative study." Jpn J Clin Oncol **41**: 40-51.
- Matsumoto, M., H. Chiji and H. Hara (2005). "Intestinal absorption and metabolism of a soluble flavonoid, α G-rutin, in portal cannulated rats." Free Radical Research **39**(10): 1139-1146.

- McNaught, A. D. and A. D. McNaught (1997). Compendium of chemical terminology, Blackwell Science Oxford.
- Milligan, J., J. Aguilera and J. Ward (1993). "Variation of single-strand break yield with scavenger concentration for plasmid DNA irradiated in aqueous solution." Radiation research **133**(2): 151-157.
- Milligan, J., J. Aguilera and J. Ward (2001). "Redox equilibrium between guanyl radicals and thiocyanate influences base damage yields in gamma irradiated plasmid DNA. Estimation of the reduction potential of guanyl radicals in plasmid DNA in aqueous solution at physiological ionic strength." International Journal of Radiation Biology **77**(12): 1195-1205.
- Moridani, M. Y., J. Pourahmad, H. Bui, A. Siraki and P. J. O'Brien (2003). "Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers." Free Radical Biology and Medicine **34**(2): 243-253.
- Motohashi, N. and Y. Saito (1993). "Competitive measurement of rate constants for hydroxyl radical reactions using radiolytic hydroxylation of benzoate." Chemical and pharmaceutical bulletin **41**(10): 1842-1845.
- Muroya, Y., S. Yamashita, P. Lertnaisat, S. Sanguanmith, J. Meesungnoen, J.-P. Jay-Gerin and Y. Katsumura (2017). "Rate constant for the $H^+ + H_2O \rightarrow \cdot OH + H_2$ reaction at elevated temperatures measured by pulse radiolysis." Physical Chemistry Chemical Physics **19**(45): 30834-30841.
- Nair, C. K., D. K. Parida and T. Nomura (2001). "Radioprotectors in radiotherapy." Journal of radiation research **42**(1): 21-37.
- Nakase, I., T. Takeuchi, G. Tanaka and S. Futaki (2008). "Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides." Advanced drug delivery reviews **60**(4-5): 598-607.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai and Y. Hara (1996). "Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical." Free Radical Biology and Medicine **21**(6): 895-902.
- O'Neill, P. (1983). "Pulse radiolytic study of the interaction of thiols and ascorbate with OH adducts of dGMP and dG: implications for DNA repair processes." Radiation research **96**(1): 198-210.
- O'Neill, P. (1994). "The role of hydration and radiation quality in the induction of DNA damage-chemical aspects." Advances in Space Research **14**(10): 221-234.
- O'Neill, P. and E. M. Fielden (1993). Primary free radical processes in DNA. Advances in radiation biology, Elsevier. **17**: 53-120.
- Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara and M. ONO (2001). "DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants." Biological and Pharmaceutical Bulletin **24**(10): 1202-1205.

- Oliver, C. N., B.-W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein and E. R. Stadtman (1987). "Age-related changes in oxidized proteins." Journal of Biological Chemistry **262**(12): 5488-5491.
- Painter, R. (1980). "The role of DNA damage and repair in cell killing induced by ionizing radiation." Radiation Biology in Cancer Research: 59-68.
- Pan, X., P. Cloutier, D. Hunting and L. Sanche (2003). "Dissociative electron attachment to DNA." Physical review letters **90**(20): 208102.
- Patil, S., N. Rao, H. Somashekarappa and K. Rajashekhar (2014). "Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation." Biomedical Journal **37**(5): 305-313.
- Patil, S. L., S. H. Mallaiah and R. K. Patil (2013). "Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation." Journal of Medical Physics/Association of Medical Physicists of India **38**(2): 87.
- Pogozelski, W. K. and T. D. Tullius (1998). "Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety." Chemical reviews **98**(3): 1089-1108.
- Pompella, A., A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata and A. F. Casini (2003). "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist." Biochemical pharmacology **66**(8): 1499-1503.
- Prise, K. M., S. Davies and B. D. Michael (1993). "Evidence for induction of DNA double-strand breaks at paired radical sites." Radiation research **134**(1): 102-106.
- Rades, D., F. Fehlaue, A. Bajrovic, B. Mahlmann, E. Richter and W. Alberti (2004). "Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients." Radiotherapy and Oncology **70**(3): 261-264.
- Rajagopalan, R., K. Wani, N. G. Huilgol, T. V. Kagiya and C. K. K. Nair (2002). "Inhibition of γ -radiation induced DNA damage in plasmid pBR322 by TMG, a water-soluble derivative of vitamin E." Journal of radiation research **43**(2): 153-159.
- Razskazovskii, Y., S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor and M. D. Sevilla (1997). "Competitive electron scavenging by chemically modified pyrimidine bases in bromine-doped DNA: Relative efficiencies and relevance to intrastrand electron migration distances." The Journal of Physical Chemistry B **101**(8): 1460-1467.
- Rekka, E. and P. N. Kourounakis (1991). "Effect of hydroxyethyl rutosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects." Journal of Pharmacy and Pharmacology **43**(7): 486-491.
- Rice-Evans, C. and N. Miller (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, Portland Press Limited.
- Richter, C., J.-W. Park and B. N. Ames (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(17): 6465-6467.

- Robak, J. and R. J. Gryglewski (1988). "Flavonoids are scavengers of superoxide anions." Biochemical pharmacology **37**(5): 837-841.
- Rodriguez, R. L. and D. T. Denhardt (1989). Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworth-Heinemann.
- Roots, R. and S. Okada (1975). "Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells." Radiat Res **64**(2): 306-320.
- Sasse, A. D., L. G. de Oliveira Clark, E. C. Sasse and O. A. C. Clark (2006). "Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **64**(3): 784-791.
- Savel'eva, O., L. Shevchuk and N. Vysotskaya (1972). "Reactions of substituted phenols with hydroxyl radicals and their dissociated form O⁻." Journal of Organic Chemistry of the USSR **8**(2): 283-286.
- Sevilla, M. D. and W. A. Bernhard (2008). "Mechanisms of direct radiation damage to DNA." Radiation Chemistry from Basics to Applications in Material and Life Science.
- Shiina, T., R. Watanabe, I. Shiraishi, M. Suzuki, Y. Sugaya, K. Fujii and A. Yokoya (2013). "Induction of DNA damage, including abasic sites, in plasmid DNA by carbon ion and X-ray irradiation." Radiation and environmental biophysics **52**(1): 99-112.
- Shikazono, N., C. Pearson, P. O'Neill and J. Thacker (2006). "The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage." Nucleic Acids Res **34**(13): 3722-3730.
- Shimoi, K., S. Masuda, M. Furugori, S. Esaki and N. Kinae (1994). "Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in γ -ray irradiated mice." Carcinogenesis **15**(11): 2669-2672.
- Shimoi, K., K. Yoshizumi, T. Kido, Y. Usui and T. Yumoto (2003). "Absorption and Urinary Excretion of Quercetin, Rutin, and α G-Rutin, a Water Soluble Flavonoid, in Rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(9): 2785-2789.
- Shiraishi, I., N. Shikazono, M. Suzuki, K. Fujii and A. Yokoya (2017). "Efficiency of radiation-induced base lesion excision and the order of enzymatic treatment." International journal of radiation biology **93**(3): 295-302.
- Steenken, S. and S. V. Jovanovic (1997). "How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution." Journal of the American Chemical Society **119**(3): 617-618.
- Stokes, R. H. and R. A. Robinson (1948). "Ionic hydration and activity in electrolyte solutions." Journal of the American Chemical Society **70**(5): 1870-1878.
- Stone, H. B., C. N. Coleman, M. S. Anscher and W. H. McBride (2003). "Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms." The Lancet Oncology **4**(9): 529-536.

- Sunada, S., H. Fujisawa, I. M. Cartwright, J. Maeda, C. A. Brents, K. Mizuno, Y. Aizawa, T. A. Kato and M. Uesaka (2014). "Monoglucosyl-rutin as a potential radioprotector in mammalian cells." Molecular medicine reports **10**(1): 10-14.
- Suzuki, Y. and K. Suzuki (1991). "Enzymatic formation of 4G- α -D-glucopyranosyl-rutin." Agricultural and biological chemistry **55**(1): 181-187.
- Swarts, S. G., D. Becker, M. Sevilla and K. T. Wheeler (1996). "Radiation-induced DNA damage as a function of hydration. II. Base damage from electron-loss centers." Radiation research **145**(3): 304-314.
- Swarts, S. G., M. D. Sevilla, D. Becker, C. J. Tokar and K. T. Wheeler (1992). "Radiation-induced DNA damage as a function of hydration: I. Release of unaltered bases." Radiation research **129**(3): 333-344.
- Torikoshi, M., S. Minohara, N. Kanematsu, M. Komori, M. Kanazawa, K. Noda, N. Miyahara, H. Itoh, M. Endo and T. Kanai (2007). "Irradiation system for HIMAC." Journal of radiation research **48**(Suppl_A): A15-A25.
- Uehara, S., H. Nikjoo and D. T. Goodhead (1999). "Comparison and assessment of electron cross sections for Monte Carlo track structure codes." Radiation research **152**(2): 202-213.
- Uesaka, M., Y. Katsumura and S. Tagawa (2011). "Electron linac facility of University of Tokyo." Nippon Genshiryoku Gakkai-Shi **53**(5): 356-360.
- Urushibara, A., N. Shikazono, P. O'Neill, K. Fujii, S. Wada and A. Yokoya (2008). "LET dependence of the yield of single-, double-strand breaks and base lesions in fully hydrated plasmid DNA films by 4He²⁺ ion irradiation." International journal of radiation biology **84**(1): 23-33.
- Urushibara, A., N. Shikazono, R. Watanabe, K. Fujii, P. O'Neill and A. Yokoya (2006). "DNA damage induced by the direct effect of He ion particles." Radiat Prot Dosimetry **122**(1-4): 163-165.
- Ushigome, T., N. Shikazono, K. Fujii, R. Watanabe, M. Suzuki, C. Tsuruoka, H. Tauchi and A. Yokoya (2012). "Yield of single- and double-strand breaks and nucleobase lesions in fully hydrated plasmid DNA films irradiated with high-LET charged particles." Radiat Res **177**(5): 614-627.
- van den Berg, R., G. R. Haenen, H. van den Berg, W. van der Vijgh and A. Bast (2000). "The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay." Food Chemistry **70**(3): 391-395.
- Visscher, K., H. Spoelder, H. Loman, A. Hummel and M. Hom (1988). "Kinetics and mechanism of electron transfer between purines and pyrimidines, their dinucleotides and polynucleotides after reaction with hydrated electrons; a pulse radiolysis study." International journal of radiation biology **54**(5): 787-802.
- von Sonntag, C. (1987). The chemical basis of radiation biology, Taylor & Francis London.

- Wallace, S. S. (1988). "AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage." Environmental Mutagenesis **12**(4): 431-477.
- Yamashita, S., Y. Katsumura, M. Lin, Y. Muroya, T. Miyazaki and T. Murakami (2008). "Water radiolysis with heavy ions of energies up to 28 GeV.: 1. Measurements of primary g values as track segment yields." Radiation Physics and Chemistry **77**(4): 439-446.
- Yokoya, A., S. M. Cunniffe and P. O'Neill (2002). "Effect of hydration on the induction of strand breaks and base lesions in plasmid DNA films by γ -radiation." Journal of the american chemical society **124**(30): 8859-8866.
- Yokoya, A., K. Fujii, T. Ushigome, N. Shikazono, A. Urushibara and R. Watanabe (2006). "Yields of strand breaks and base lesions induced by soft X-rays in plasmid DNA." Radiation protection dosimetry **122**(1-4): 86-88.
- Yokoya, A., N. Shikazono, K. Fujii, A. Urushibara, K. Akamatsu and R. Watanabe (2008). "DNA damage induced by the direct effect of radiation." Radiation Physics and Chemistry **77**(10-12): 1280-1285.
- Yu, H., J. S. Haskins, C. Su, A. Allum, A. H. Haskins, V. A. Salinas, S. Sunada, T. Inoue, Y. Aizawa, M. Uesaka and T. A. Kato (2016). "In vitro screening of radioprotective properties in the novel glucosylated flavonoids." Int J Mol Med **38**(5): 1525-1530.
- Yu, H. and S. Yamashita (2019). "Radical scavenging and chemical repair of rutin observed by pulse radiolysis: as a basis for radiation protection." Free Radical Research **53**(9-10): 1005-1013.
- Zhao, M. J., L. Jung, C. Tanielian and R. Mechin (1994). "Kinetics of the Competitive Degradation of Deoxyribose and other Biomolecules by Hydroxyl Radicals Produced by the Fenton Reaction." Free Radical Research **20**(6): 345-363.
- 岡部弘高 and 甲斐昌一 (2007). "酸化ストレスと心血管病酸化ストレスと心血管病."
- 吉川敏一 (1998). "フラボノイドの医学." 講談社サイエンティフィック.
- 吉川敏一, 河野雅弘 and 野原一子 (2000). 活性酸素・フリーラジカルのすべて: 健康から環境汚染まで, 丸善.
- 吉川敏一 and 中川修史 (1998). "フリーラジカルと抗酸化物質." 抗酸化物質のすべて (吉川敏一編著) pp: 15-23.
- 工藤久明 (2011). 放射線利用, オーム社.
- 小林一雄 (2017). "10 放射線誘起反応による DNA 損傷." Radioisotopes **66**(10): 479-487.
- 渡邊立子, 甲斐健師 and 服部佑哉 (2017). "16 計算機シミュレーションによる放射線生物作用の初期過程の研究." Radioisotopes **66**(11): 525-530.
- 飯田博美 (2005). 放射線概論, 通商産業研究社.
- 楊金峰 and 吉田陽一 (2017). "2 高速パルスラジオリシスと短寿命中間活性種の検出." Radioisotopes **66**(10): 395-406.

楊金峰, 近藤孝文, 菅晃一, 神戸正雄 and 吉田陽一 (2015). "超高速パルスラジオリシスの現状と展望 (100 号記念特集)--(放射線化学の現状と展望: 放射線照射装置(線源) の進歩)." 放射線化学(100): 52-55.

謝辞

本論文は、東京大学工学系研究科原子力国際専攻の博士課程での内容を取りまとめたものです。本研究の遂行におかれまして、学内外の多くの関係者様から支援やご指導を頂きました。関係者の皆様から心から深く感謝いたします。

山下真一先生は本研究の指導教員であり、修士課程から研究推進に携わって下さいました。研究テーマの着目点から日々の実験進行状況まで、丁寧に指導をくださり、実験と作業環境の構築や共同研究・外部連携において、大変ご尽力して頂きました。在学中には様々なことでお世話になり、事例をあげれば枚挙にいとまがありません。研究生活を通じて、学術で見解がより深く広くなっただけでなく、人生における哲学的な部分も学ばせていただきました。粘り強く最善に向けて最大限の努力をする姿勢を身をもって教えて頂きました。おかげさまで自分自身が日々成長していることを実感し、大変感謝しております。

上坂充先生は修士課程からの指導教員で、研究内容の工学的な応用面についてご指導を多く頂きました。本研究は放射線生化学を中心とした基礎的な研究としての色付けが濃く、筆者が研究の出口を迷走している際、上坂先生は俯瞰的な観点から研究成果の応用についてご指導下さいました。幅広い知識や経験を持つ先生から研究の部分的なこと、それぞれの研究関連性や応用場面を教えてくださいました。上坂先生のおかげで、応用に向けた基礎研究がいかに重要であることがよく理解できました。

原子力専攻の工藤久明先生にも研究を行う上での助言を頂きました。

同研究室の学術支援職員だった関口萌氏、及び学術支援職員の長谷川佳代子氏には修士課程から長い間お世話になりました。博士前期課程から始まった五年間では東海や放医研への出張など、学外にいる時間が多い中、煩わしさを厭うことなく書類の手続きをいつも丁寧にしてくださいました。代行して下さったこともしばしばありました。おかげさまで、内部・外部への提出資料など、遅延なくスムーズに進められたことに大変感謝しております。最終学年になってからは、武居美枝氏や峯尾知子氏からも同じ立場で協力してくださいました。研究の順調な進捗、また本論文としてまとめるにあたって、上記四氏の協力が重要でした。

同研究室に在籍していた張宰雄（JANG Jae-Woong）博士はほぼ同時期に研究室の博士前期課程に入り、ともに博士後期課程へ進みました。研究テーマは異なりますが、在学時期が重なったこともあり、ともに経験や情報を共有し、時には悩みも聞かせてくれました。研究がうまく進められなかった時にはいつも張氏から励ましてくれました。

上坂研究室の皆さんも様々な面において協力していただきました。同様の分野を研究している永井菜月氏や近藤勇佑氏と実験結果の議論などを行い、有意

議な助言を頂きました。特に近藤勇佑氏に本論文を含めて、たくさんの校閲にして頂きました。

出町研究室の陳実氏にも大変協力していただきました。

学外の研究者の方々にもお世話になりました。

量子科学技術研究開発機構（以下、量研機構）高崎量子応用研究所放射場生体分子科学研究グループの実習生として活動しました。受け入れていただいたグループリーダーの横谷明德先生のもとに、東海村を拠点として実験活動をしました。一からプラスミド関連実験の操作手順を教えていただいたり、筆者のために実験など作業環境の整備をしてくださったりなど、多大な工夫や心遣いをいただきました。もう少し濃密に横谷先生と実験結果を議論できれば、もっと良い研究成果が出せたのではないかと考えております。

同グループの藤井健太郎博士をはじめ、多くの方々が実験の協力をしてくださいました。また、同グループの茨城大学理学系研究科の中上裕貴氏、鯉渕誠也氏、小畑結衣氏、平寄敬志朗氏にも同様の研究テーマでプラスミド DNA の実験を行っていたため、操作手法の情報共有や実験結果の議論など、有益な助言を頂きました。

同量研機構・量子医学医療部門（旧放射線医学総合研究所）の平山亮一先生、村上健先生は実習生として受け入れてくださり、HIMAC 施設の円滑な利用に尽力してくださいました。

大阪大学の室屋裕佐先生、日本原子力研究開発機構の熊谷友多博士や端邦樹博士、中国科学技術大学の翁漢欽博士には実験手法や結果についての助言を頂きました。

本論文の一部は、日本学術振興会特別研究員奨励費の助成をいただいています（課題番号：18J12179）。また、本論文の一部は、HIMAC 共同利用研究課題のもとに作成しています（課題番号：16J419、19J419）。

妻や両親をはじめ、家族の方々や友人などに暖かく見守っていただきました。特に妻からは献身的な支えを頂きました。生活面・精神面の支援を頂き、最も頼りになる力となってくれました。最高の敬意を捧げます。

而立の年に立ち、学問に対する探究心を保ち、より優れた教養である人間に向けて邁進してまいります。

令和2年2月吉日

付録

プラスミド DNA の抽出

- 試薬と試料

LB 培養液 1 L

Difco™ LB Broth、Lennox 粉末	20 g
(Tryptone)	10 g)
(Yeast Extract)	5 g)
(Sodium Chloride)	5 g)

*上記粉末を超純水 1 L でメスアップし、滅菌処理をする。

リン酸緩衝液 0.2 M / 2 mM

QIAfilter Plasmid Mega Kit

(組成分は Handbook (English Ver) に参照)

Buffer	Composition	Storage
Buffer P1 (resuspension buffer)	50 mM Tris·Cl、pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A	2–8°C、after addition of RNase A
Buffer P2 (lysis buffer)	200 mM NaOH、1% SDS (w/v)	15–25°C
Buffer P3 (neutralization buffer)	3.0 M potassium acetate、pH 5.5	15–25°C or 2–8°C
Buffer QN (elution buffer)	1 M potassium acetate pH 5.0	15–25°C
Buffer FWB2 (QIAfilter wash buffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS、pH 7.0; 15% isopropanol (v/v) ; 0.15% Triton® X-100 (v/v)	15–25°C
Buffer QBT (equilibration buffer)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS、pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C

Buffer QC (wash buffer)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris·Cl、pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
Buffer QF (elution buffer)	1.6 M NaCl; 50 mM MOPS、pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C

イソプロパノール	適量
70%エタノール	100 mL
エタノール (99.5%)	70 mL

エタノール (99.5%) を超純水で希釈する。

*滅菌水 (超純水をオートクレーブで滅菌したもの) の使用を推奨する

機器	メーカーと製品名
高速大容量冷却遠心機	KUBOTA 7780 (東海)
	HIMAC CF-16RN (東京)
振とう機用恒温チャンバー	EYELA FMS-1000 (前培養)
	EYELA LET-500 (本培養)
振とう培養機	TAITEC BioShaker V BR-36 (前培養)
	EYELA MULTI SHAKER MMS (本培養)
吸引装置	Thermo S1 Pipet
上皿天秤	MS-500 (村上衡器製作所)
真空乾燥機	TAITEC CENTORIFUGAL CONCENTRATOR VC-36N
分光光度計	Thermo GENESYS 10S UV-Vis (東海)
	JASCO V-730ST (東京)

- 操作手順

(前培養)

1. カルチャーチューブに LB 培地 2 mL、アンプシリン 2 μ L (25 mg/mL) を入れた。
2. ディープフリーザー (-80°C) から大腸菌 E. coli JM 109 を取り出して、白金耳で 3 μ L 程度 (白金耳で触れたぐらい) JM 109 をカルチャーチューブに入れ、半閉め状態にして恒温振とう機内で 37 度、6-8 時間に振盪培養した。
3. 培養後、大腸菌原液の O.D. (Optical Density) を 600 nm で測定した。本培養開始する前に、O.D.が 0.6 程度となるような菌液濃度が望ましい。

(本培養)

4. 滅菌した 500 mL 三角フラスコに LB 培地 250 mL、25mg/mL Ampicillin 250 μ L を入れ、前培養で得られた大腸菌溶液 1 mL を加えて、250 倍程度希釈する。その後 37°Cの振とう培養機内で 12-16 h 振とう培養した。
5. 振とう培養後 OD を測定し、250 mL ずつ専用遠心容器に移り入れて、4 °Cで 6、000 x g、15 分間遠心分離し、培養液を取り除き、大腸菌を回収した。
6. 50 mL の Buffer P1 を大腸菌に添加して再懸濁させた。
*以降、記述した添加溶液の容量は、500 mL の大腸菌培養液に対するものとする。使用した抽出キットは Mega kit サイズである。
7. 50 mL の Buffer P2 を添加し、十分に溶液を混和させ、室温 (約 15~25 °C) で 5 分間放置する。このとき溶液は青色となっている。
*放置している間に QIAfilter Cartridge を準備する。QIAfilter Cartridge をねじ口瓶につなぐ。
8. Buffer P3 (4 °C保存) を 50 mL を大腸菌溶液中に添加し、ピペットを用いて十分に溶液を混和させて、大腸菌溶液を QIAfilter Cartridge に入れて、室温で 10 分間放置する。このとき溶液は白色で、沈殿物が生じている。
9. 吸引装置で溶液をフィルターに通過させた。
10. ろ過後、QIAfilter Cartridge 内に更に 50 mL の Buffer FWB2 を入れ、吸引ろ過させた。

*このプロセスは、Cartridge 内に残存したプラスミド DNA を回収し、DNA の回収率を向上させるために行った。

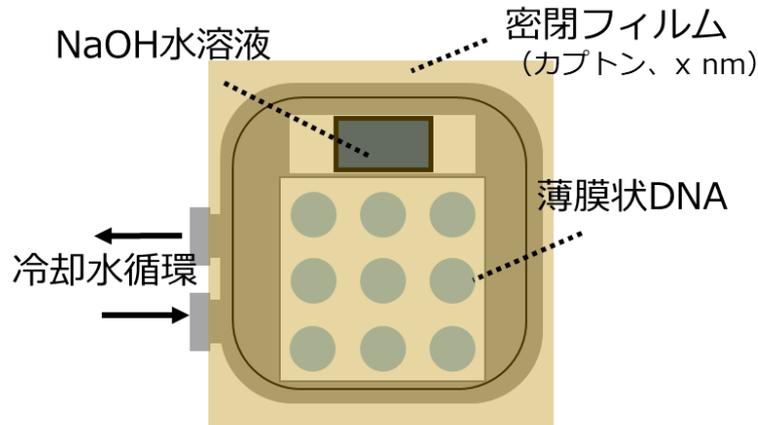
11. QIAGEN-tip 2500 に 50 mL の Buffer QBT を加え、Tip 内が完全に空になるまでに静置した。
*QBT 液で Tip 内を平衡化させ、よりスムーズに DNA 溶液をろ過・洗浄できるようにするためこの操作を行った。
12. 吸引装置で通過させたろ液をすべて QIAGEN-tip 2500 でろ過する。
13. 200 mL の Buffer QC で Tip 内に残留した DNA を洗浄した。
14. 35 mL の Buffer QF で Tip 内に残留した DNA を溶出した。
15. DNA 溶液に対し、0.7 倍 v/v (=24.5 mL) のイソプロパノールを添加して室温で DNA を沈澱させる。その後遠心分離装置で 4°C、15000 x g、30 分間遠心する。その後、上澄み液をしっかりと取り除く。
16. 5 ml の 70 %エタノールを加えて、4°C、15000 x g、10 分間遠心する。上澄み液を取り除いて、自然乾燥させた。
17. リン酸緩衝液などでプラスミド DNA を回収した。
18. 回収した DNA 溶液を 10 倍程度に希釈し O.D. を 260 nm で測定した。
「DNA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の際に、O.D. 260=0.02」のもとに DNA の濃度を計算できる。

DNA サンプル調製

- 試薬と機器

プラスミド DNA	適量
10 mM リン酸に水素ナトリウム	500 mL
NaH ₂ PO ₄ (MW=119.98)	0.6 g (1.2 g/L)
(or NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O, MW=156.01)	0.78 g (1.56 g/L)
*500 mL 滅菌水でメスアップする。	
10 mM リン酸水素二ナトリウム	500 mL
Na ₂ HPO ₄ (MW=141.96)	0.71 g (1.42 g/L)
(or Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, MW=358.14)	1.79 g (3.58 g/L)
*500 mL 滅菌水でメスアップする。	
10 mM リン酸緩衝液	1 L
*10 mM リン酸水素二ナトリウム (500 mL) と 10 mM リン酸に水素ナトリウム (500 mL) を添加して所定の pH 値に合わせる。	
1 mM リン酸緩衝液	1 L
*10 mM リン酸水素二ナトリウム (50 mL) と 10 mM リン酸に水素ナトリウム (50 mL) を添加して所定の pH 値に合わせる。	
1 mM MG-Rutin with リン酸緩衝液 (1、10 mM)	200 mL
αG-Rutin (Molecular Weight=772.5 g/L)	0.154 g
*粉末状 αG-Rutin 0.154 g (200 μmol) をリン酸緩衝液に溶かす。	

機器	メーカーと製品名
	22 x 22 mm
ガラスプレート	(厚み 0.45-0.6mm、Matsunami、Tokyo、Japan)
超音波装置	AS ONE UPS Type (東海)
洗浄剤	DCN 90 (東京)
凍結乾燥機	EYELA FDU-1200
トライチャンバー	EYELA DRC-3L
真空ポンプ	adixen pascal 2010 sd
カプトンフィルム	Kapton EN-30、50H/V



上から見た配置図

- 操作手順

(DNA 希薄水溶液)

*必要に応じて（一般的には $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）所定濃度までに希釈した。

(フィルム DNA)

1. 2-5%程度の DCN を用いて、80 度以上の熱水内で 30 分以上保温し、超純水で 3 回程度リンスする。その後、80 度以上の超純水内で更に 30 分以上保温し、超純水で 3 回程度リンスした後、乾燥機内で乾燥させる。

*一部の実験では、以下の操作を行った。

（カバーガラスを界面活性剤のあるビーカーに入れて、超音波洗浄機で 5 分間洗浄する。その後、精製水で 3 回ほどリンスした後、精製水を入れたビーカー内に置き、超音波で 5 分間洗浄した。最後に 100 % EtOH 中に超音波洗浄機で 5 分間洗浄し、キムワイプ上で乾燥させた。）

2. 解凍したプラスミド DNA 溶液を、2 mM Phosphate Buffer で $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように希釈した。

*一部の実験では、以下の操作を行った。

（解凍したプラスミド DNA 溶液に、 $1\times\text{TE}$ 緩衝液で $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈した。）

3. ガラスプレート上に、プラスミドの希釈液を $5 \mu\text{L}$ ($0.75 \mu\text{g}$ 、ヌクレオチドモル数 11.5 nmol) で 1 スポットとし、4 または 9 スポットに滴下した。

*一部の実験では、以下のような手順とした。

(ガラスプレート上に、プラスミドの希釈液を 15 μ l (0.75 μ g、ヌクレオチドモル数 11.5 nmol) で 1 スポットとし、4 スポットに滴下した。)

4. ガラスプレートをプレートホルダーに両面テープで固定し、送風による自然乾燥後、真空乾燥機で 30 分乾燥させることで薄膜状 DNA にする。その時、ヌクレオチドあたりの水分子数は約 4 個と概算できる。
5. DNA 薄膜をガラスプレートごとアルミニウム製 (もしくはステンレス製) の照射サンプルホルダーに固定し、DNA 薄膜に接触しないように 3.84/8.18 N 水酸化ナトリウム溶液 500 μ L をホルダー内に入れ、ホルダー全体をカプトンフィルムで接着剤を用いて密封した。
6. ホルダーを 4-5.6 $^{\circ}$ C の低温状態で 15 時間以上に保った。
7. サンプル照射を行なった後に、DNA サンプルを調製前の DNA 容量の 3 倍程度の 1 \times TE 緩衝液 (DNA が 45 μ L の場合は、TE を 135 μ L 使用) で回収した。次の処理を行うまで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

照射

- 機器

X 線照射装置 **SOFTEX M-150WE (東海)**

希薄水溶液 : 11.82 Gy/min (エッペンチューブ蓋あり)

水和 DNA : 18.73 Gy/min (照射口付近、最大照射線量)

X 線照射装置 **mediXtec MX-160Labo (東京)**

Tube voltage : 160 kVp 、 Tube current : 3 mA、最大出力 480W、照射口付近最大照射線量 2.3Gy/min

重粒子線 **(放医研 HIMAC)**

$^{12}\text{C}^{6+}$ 、290 MeV/unit (LET=13 keV/ μm)

$^{56}\text{Fe}^{26+}$ 、500 MeV/unit、LET : 183 keV/ μm (Yamashita et al. 2008)

- 操作手順

(DNA 希薄水溶液、Softex)

1. X 線照射装置の冷却水バルブを作動させ、鍵を使い SOFTEX の電源を ON にした。
2. 照射する前に、X 線照射装置をエイジング (慣らし運転) した。
3. ジャッキ高さを 150.5mm にし、その上に照射用チューブ立てを設置し、チューブ立てに DNA 溶液 (60 μL) が入った 1mL マイクロチューブをセットした。なお、低温状態を保つために、チューブ立て内に氷水を充填し、必要に応じて適宜氷を添加した。
4. 事前に最適化した X 線照射野に入れて、吸収線量に応じた照射時間をセッティングして照射を行った。
5. 照射したサンプルをチューブに回収した。一時的に作業を中止する際には、照射したサンプルを冷蔵庫 (-20°C) に保管した。

(フィルム状 DNA、Softex)

1. X 線照射装置の冷却水バルブを作動させ、鍵を使い SOFTEX の電源を ON にした。
2. 照射する前に、X 線照射装置をエイジング (慣らし運転) 操作を行った。

3. ジャッキ高さを 144 mm にし、その上に照射用チューブ立てを設置した。
4. 事前に最適化した X 線照射野に入れて、吸収線量に応じた照射時間をセッティングして照射を行った。
5. 照射したサンプルを回収し、生化学的処理を行った。一時的に作業を中止する際には、照射したサンプルを冷蔵庫 (-20°C) に保管した。

酵素処理

- 試薬と機器

3M 酢酸ナトリウム **200 mL**

酢酸ナトリウム無水物 49.2 g

*120 mL 程度の滅菌水に溶かし 200 mL 滅菌水でメスアップする。

70% エタノール **100 mL**

0.5M EDTA **500 mL**

EDTA · 2Na (2H₂O) 93.06 g

*300 mL 程度の滅菌水に溶かし 500 mL 滅菌水でメスアップする。

1×TE Buffer **1 L**

(10 mmol dm⁻³ Tris、1 mmol dm⁻³ EDTA、pH 8.0)

Tris 1.21 g

(1M トリス塩酸バッファー) 10 mL

0.5 EDTA 2 mL

*1 L 滅菌水でメスアップする。

40 mM HEPES **500 mL**

(EDTA 0.5 mmol dm⁻³、KCl 0.1 mmol dm⁻³)

HEPES 4.77 g (20 mmol)

KCl 3.73 g (0.05 mol)

0.5 M EDTA 0.5 mL

*500 mL 滅菌水でメスアップし、pH=8.0 となるよう KOH で調整する。

BSA (Bovine Serum Albumin) **5 mL**

(20 mg/mL)

BSA 100 mg

*5 mL 滅菌水に溶かして、分注する。

DTT (Dithiothreitol) **5 mL**

(50 mmol dm⁻³)

DTT 38.56 mg

*5 mL 滅菌水に溶かして、分注する。

機器	メーカーと製品名
遠心機	HIMAC CF-15RXII (東海)
	HIMAC CF-16RN (東京)
恒温器	NISSIN INCUBATOR SN-100SD (東海)
	AS ONE THB-1400 (東京)

- 操作手順

1. 照射した DNA 試料を 20 μ L ずつに分割した (Control、Mock、Nth、Fpg)。
2. DNA 試料 20 μ L に対し、3M 酢酸ナトリウム 2 μ L (10% v/v) を加えてタッピングした。更に 100%エタノールを 50 μ L (250% v/v) 加えてタッピング後、-5°C の冷凍庫で 30 分間冷却した。Control サンプルにはここで処理せず、氷上で放置した。
3. 遠心機を用いて 15000 x g で 30 分間 (4°C) 遠心し、遠心された DNA を巻き込まないように丁寧にデカントした後、70%エタノールを 50 μ L 加え 15000 x g で 10 分間遠心した。
4. 遠心している間に、HEPES バッファーに 1% (v/v) BSA、DTT を入れた。
5. 遠心した DNA サンプルをデカントし、自然乾燥させ、所定のバッファーを置換した (“Mock” は 18 μ L HEPES Buffer、“Nth”、“Fpg”は 18 μ L HEPES Buffer) 。
 - Mock サンプルとは、酵素処理をせずに、熱処理だけ行ったサンプルを指す。Nth、Fpg は塩基除去修復酵素の種類である。
6. DNA 試料に、2 μ L 「Nfo、Nth、Fpg」を最適濃度*になるように加えて 37°C に保持したウォーターバス内で 30 分間酵素と反応させた。Control サンプルはここで処理せず、氷上で放置した。
 - Nth: 2.5 units / 1 μ g DNA
 - Fpg: 0.016 units / 1 μ g DNA
7. サンプルを氷上に戻し、Fpg、Nfo など塩基切断酵素添加したサンプルに対して、5 μ L の 0.5M EDTA を添加して酵素を失活させた。
8. 電気泳動をかけた。

電気泳動

- 試薬と機器

10×TBE Buffer

1 L

(0.89 M Tris、0.89 mM Boric Acid、20 mM EDTA)

Tris	107.8 g (0.89 mol)
Boric Acid	55 g (0.89 mol)
EDTA/2 Na (2H ₂ O)	7.4 g (20 mmol)
(or EDTA 0.5 M)	40 mL)

*1 L 滅菌水でメスアップした。

アガロースゲル

240 / 150 mL

(1% Weight (g) / Volume (mL))

アガロースゲル	2.4 / 1.5 g
TBE バッファー	240 / 150 mL

*天秤で量り取ったアガロースゲル粉末とメスシリンダーで計量した所定容量の 1 x TBE Buffer 両者を三角フラスコに入れ、電子レンジで温めた。沸騰させて完全に溶解させてから、60°C程度まで冷却し、型に流して入れて固めた。(16h 電気泳動するゲル用)

アガロースゲル (Mupid®-2x 用)

13 / 26 mL

(1% Weight (g) / Volume (mL))

アガロースゲル	0.13 / 0.26 g
TAE バッファー	13 / 26 mL

*電子天秤で粉末状のアガロースゲルを量り取り、TAE Buffer とともに三角フラスコに加え、電子レンジで温めた後に、型に流して入れた。

EtBr

適量

(10mg/mL)

*DNA 水素結合部位にインタカレーションすることで、DNA の位置状況を確認できる染色剤である。

- 操作手順

1. アガロースゲル (1% W/V) を電気泳動槽内に入れ、1×TBE buffer で槽内を満たし、ウェルにサンプルを加えた後、電気泳動装置を冷蔵状態 (5.6°C) で最大時間 (999 分間) 電気泳動 (200 mA、40 V) をかけた。

2. EtBr (10 mg/mL) 入りの 1 × TBE 溶液内に泳動したゲルを入れ、30-60 分間放置または振とうしながら染色させた。
3. 染色したゲルを Ettan DIGE (GE ヘルスケア、USA) または WSE-5300 (ATTO、JAPAN) で撮影した。
4. DNA に結合した EtBr の蛍光バンドを検出した後に、ソフトウェア Image Quant TL (GE ヘルスケア、USA) または CS Analyzer (Ver 4、ATTO、JAPAN) でその強度を測定した。